

**STRUKTUR - FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN
VON MENSCHLICHEM PLASMAKALLIKREIN UND
SEINEN KOMPLEXEN MIT HMW KININOGEN
UND $C1$ -INHIBITOR MITTELS
MONOKLONALER ANTIKÖRPER**

JOHANN HOCK

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

STRUKTUR-FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN VON
MENSCHLICHEM PLASMAKALLIKREIN UND SEINEN KOMPLEXEN
MIT HMW KININOGEN UND C1^- -INHIBITOR
MITTELS MONOKLONALER ANTIKÖRPER

DISSERTATION DER FAKULTÄT
FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

vorgelegt von
Johann Hock
Januar 1987

1. Berichterstatter: PD Dr. W. Müller-Esterl
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Zenk
- Tag der mündlichen Prüfung: 25. Februar 1987

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 15.10.82 - 30.9.86 an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. H. Fritz) angefertigt.

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes bedanke ich mich bei Prof. Dr. H. Fritz.

Herrn Prof. Dr. M. Zenk danke ich für die Betreuung seitens der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Werner Müller-Esterl für die engagierte Betreuung der Arbeit und für anregende Diskussionen.

Frau Annemarie Oettl danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung von Enzymimmunoassays.

Herrn Dr. P. Scheuber und den Mitarbeitern des Tierlabors danke ich für die Hilfe bei Immunisierungen und die Versorgung der Versuchstiere.

Allen übrigen Kolleginnen und Kollegen im Labor, die auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Meiner Frau Marlies danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

A.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
B.	EINLEITUNG.....	2
B. 1.	Regulation physiologischer Prozesse durch proteolytische Systeme.....	2
B. 2.	Kallikreine als Bestandteile proteolytischer Systeme.....	2
B. 3.	Molekulare Parameter von Plasmakallikrein.....	3
B. 4.	Physiologische Funktionen von Plasmakallikrein..	5
B. 4.1.	Kontaktphasenaktivierung.....	5
B. 4.2.	Interaktionen von Plasmakallikrein mit weiteren regulatorischen Systemen.....	7
B. 5.	Kontrolle von Plasmakallikrein durch Inhibitoren.....	8
B. 5.1.	Plasmatische Inhibitoren von Plasmakallikrein...	8
B. 5.2.	Charakterisierung von Cl^- -Inhibitor.....	8
B. 5.3.	Reaktion von Plasmakallikrein mit Cl^- -Inhibitor..	9
B. 6.	Quantifizierung von Plasmakallikrein.....	9
B. 7.	Aufgabenstellung und Ziele.....	10
C.	MATERIAL UND METHODEN.....	11
C. 1.	Material.....	11
C. 1.1.	Geräte.....	11
C. 1.2.	Substanzen, Materialien.....	12
C. 2.	Methoden.....	15
C. 2.1.	Proteinchemische Methoden.....	15
C. 2.1.1.	Isolierung von Plasmakallikrein durch Affinitätschromatographie.....	15
C. 2.1.2.	Isolierung von Plasmakallikrein durch Immunaaffinitätschromatographie.....	15
C. 2.1.3.	Isolierung der leichten Kette von Plasmakallikrein.....	16
C. 2.1.4.	Isolierung von Cl^- -Inhibitor.....	17
C. 2.1.5.	Isolierung des Plasmakallikrein- Cl^- -Inhibitor-Komplexes.....	17
C. 2.1.6.	Isolierung von Antikörpern.....	18
C. 2.1.7.	Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose.....	19
C. 2.1.8.	Kopplung von Immunglobulinen an CNBr-aktivierte Sepharose.....	19
C. 2.1.9.	Biotinylierung von Proteinen.....	20
C. 2.1.10.	^{125}I -Markierung von Proteinen.....	20
C. 2.2.	Immunologische Methoden.....	21
C. 2.2.1.	Produktion polyklonaler Antikörper.....	21

C. 2.2.2.	Produktion monoklonaler Antikörper.....	21
C. 2.2.3.	Enzymimmunoassay.....	23
C. 2.2.4.	Western Blot und Immunoprint.....	25
C. 2.2.5.	Bestimmung apparenter Affinitätskonstanten	26
C. 2.2.6.	Immunelektrophorese.....	27
C. 2.3.	Sonstige Methoden.....	27
C. 2.3.1.	Diskontinuierliche SDS-Elektrophorese.....	27
C. 2.3.2.	Bestimmung der amidolytischen Aktivität von Plasmakallikrein.....	28
C. 2.3.3.	Limitierte Proteolyse von HMW Kininogen mit Plasmakallikrein.....	28
C. 2.3.4.	Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit....	29
C. 2.3.5.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	29
C. 2.3.6.	Proteine und Reagenzien aus dem Laborbestand....	29
D.	ERGEBNISSE.....	31
D. 1.	Isolierung von Plasmakallikrein.....	31
D. 2.	Isolierung von Plasmaprokallikrein.....	31
D. 3.	Charakterisierung von Plasma(pro)kallikrein.....	32
D. 3.1.	Aktivierung von Prokallikrein durch β -Faktor XIIa.....	32
D. 3.2.	Limitierte Proteolyse von HMW Kininogen.....	34
D. 3.3.	Prokoagulatorische Aktivität von Prokallikrein..	34
D. 4.	Isolierung der leichten Kette von Plasmakalli- krein.....	35
D. 5.	Isolierung und Charakterisierung von C $\bar$ I-Inhibi- tor.....	36
D. 6.	Isolierung des Plasmakallikrein-C $\bar$ I-Inhibitor- Komplexes.....	38
D. 7.	Produktion von Antikörpern.....	41
D. 7.1.	Produktion polyklonaler Antikörper.....	41
D. 7.2.	Produktion monoklonaler Antikörper.....	42
D. 7.2.1.	Monoklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein...	42
D. 7.2.2.	Monoklonale Antikörper gegen C $\bar$ I-Inhibitor.....	45
D. 7.2.3.	Monoklonale Antikörper gegen den Plasmakalli- krein-C $\bar$ I-Inhibitor-Komplex.....	46
D. 8.	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper...	47
D. 8.1.	Bestimmung der Antikörper-Subtypen.....	47
D. 8.2.	Einteilung der Antikörper nach ihrer relativen Epitopspezifität.....	49
D. 8.3.	Bestimmung apparenter Affinitätskonstanten	51
D. 9.	Interaktion monoklonaler Antikörper mit physio- logischen und enzymatischen Funktionen von Plasmakallikrein.....	54
D. 9.1.	Einfluß von Antikörpern auf die amidolytische Aktivität von Plasmakallikrein.....	54

D. 9.2.	Einfluß der Antikörper auf die Aktivierung von Prokallikrein durch β -Faktor XIIa.....	55
D. 9.3.	Einfluß der Antikörper auf die Proteolyse von HMW Kininogen durch Plasmakallikrein.....	56
D. 9.4.	Einfluß der Antikörper auf die prokoagulatorische Wirkung von Prokallikrein.....	58
D. 9.5.	Einfluß der Antikörper auf die Komplexbildung von HMW Kininogen und Plasmakallikrein.....	60
D. 10.	Versuche mit biotinyliertem Prokallikrein.....	65
D. 10.1.	Korrektur der partiellen Thromboplastinzeit von Fletcher-Plasma.....	66
D. 10.2.	Bindung von monoklonalen Antikörpern an biotinyliertes Prokallikrein.....	66
D. 11.	Untersuchung der Kreuzreaktion von PK 6 mit Faktor XI.....	66
D. 12.	Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Quantifizierung des Plasmakallikrein-CI-Inhibitor-Komplexes im Plasma.....	68
D. 12.1.	Auswahl geeigneter Antikörper gegen Plasmakallikrein und CI-Inhibitor.....	69
D. 12.2.	Spezifität des ELISAs.....	70
D. 12.3.	Ermittlung einer geeigneten Plasmaverdünnung für die Komplexbestimmung.....	71
D. 12.4.	Test verschiedener pathologischer Plasmen.....	72
E.	DISKUSSION.....	74
E. 1.	Monoklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein...	74
E. 2.	Interaktionen der monoklonalen Antikörper mit enzymatischen Funktionen des Plasmakallikreins.....	76
E. 3.	Interaktionen der monoklonalen Antikörper mit der Komplexbildung von Prokallikrein und HMW Kininogen.....	77
E. 4.	Kreuzreaktion von PK 6 mit Faktor XI.....	78
E. 5.	Epitopspezifität der Antikörper.....	78
E. 6.	Produktion monoklonaler Antikörper gegen den Plasmakallikrein-CI-Inhibitor-Komplex.....	79
E. 7.	Quantifizierung des Plasmakallikrein-CI-Inhibitor-Komplexes im Plasma.....	80
E. 8.	Ausblick.....	81
F.	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
G.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	91
	Lebenslauf.....	92

A. ZUSAMMENFASSUNG

1. Prokallikrein und $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor wurden mittels Immunaффinitätschromatographie aus Humanplasma isoliert. Die Ausbeuten betrugen 12 % für Prokallikrein und 50 % für $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor. Die SDS-Elektrophorese ergab, daß Prokallikrein in zwei Varianten mit apparenten Molekulargewichten von 85 000/83 000 vorlag; $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor war homogen mit einem Molekulargewicht von 120 000. Nach Aktivierung des Prokallikreins mit β -Faktor XIIa wurde der Kallikrein- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplex präparativ dargestellt; das apparente Molekulargewicht betrug 210 000.
2. Monoklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein, $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor und den Komplex wurden mit der Hybridoma-Technik hergestellt. Die nähere Charakterisierung von 16 monoklonalen Antikörpern gegen Plasmakallikrein ergab, daß 7 gegen die schwere und 9 gegen die leichte Kette des Kallikreins gerichtet waren. Mit Hilfe eines Kompetitestests wurde ermittelt, daß die Antikörper gegen 5 verschiedene Epitopgruppen (3 Epitope der schweren, 2 Epitope der leichten Kette) gerichtet waren. Die Bestimmung der Affinitätskonstanten in einem Festphasenradioimmunoassay ergab Werte im Bereich von $0.5 - 7.0 \times 10^8$ l/mol.
3. Der Einfluß von Antikörpern unterschiedlicher Epitopspezifität auf Funktionen des Plasmakallikreins wurde untersucht. Antikörper gegen die leichte Kette modulierten die Enzymaktivität durch Stimulation oder Hemmung, während Antikörper gegen die schwere Kette des Kallikreins keinen Effekt auf die Hydrolyse chromogener Substrate hatten. Die Spaltung des hochmolekularen Substrats HMW Kininogen durch Kallikrein sowie die Aktivierung von Prokallikrein durch β -Faktor XIIa wurde von keinem der untersuchten Antikörper beeinflusst.
4. Der Antikörper PK 6, der gegen die schwere Kette von Kallikrein gerichtet ist, hemmte die prokoagulatorische Aktivität des Enzyms bei der Kontaktphasenaktivierung. Kompetitionsanalysen mittels ELISA bzw. Immunelektrophorese zeigten eindeutig, daß PK 6 die Bindungsregion für HMW Kininogen am Plasmakallikrein erkennt. Damit steht eine immunologische Sonde zur Lokalisation dieser Bindungsregion zur Verfügung. PK 6 zeigte auch eine Kreuzreaktion mit Faktor XI, der mit Plasmakallikrein um die HMW Kininogen-Bindung konkurriert.
5. Unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen Plasmakallikrein und eines monoklonalen Antikörpers gegen $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor wurde ein Sandwich-ELISA zur Quantifizierung des Plasmakallikrein- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplexes im Plasma etabliert. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 3 - 4 ng/ml; damit kann eine Aktivierung von 0.4 % des Prokallikreins detektiert werden. Die Normalkonzentration des Komplexes im Plasma liegt deutlich unter 0.3 $\mu\text{g/ml}$, während unter pathologischen Bedingungen Komplexkonzentrationen bis zu 14.5 $\mu\text{g/ml}$ gefunden wurden.

B. EINLEITUNG

B. 1. Regulation physiologischer Prozesse durch proteolytische Systeme

Proteolytische Enzyme ("Proteinasen") spielen in allen Organismen eine bedeutende Rolle. Sie sind unerläßliche Werkzeuge für den Abbau von Fremdproteinen und den Katabolismus körpereigener Proteine. Neben diesen Protein-abbauenden Enzymen existieren in allen höheren Lebewesen Proteinasen bzw. Kaskaden von Proteinasen ("proteolytische Systeme"), die einer fein abgestimmten Regulation unterliegen und wichtige physiologische Vorgänge durch limitierte Proteolyse steuern. Dazu gehören z.B. die Prozessierung von sekretorischen Proteinen während der Membrantranslokation oder die Freisetzung von Peptidhormonen aus Vorläuferproteinen. Von besonderer Bedeutung sind Proteinase bei der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, dem Komplementsystem und der Blutdruckregulation (Neurath, 1984).

Die Regulation der proteolytischen Aktivität kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen: die Aktivierung inaktiver Proenzyme (Zymogene) durch limitierte Proteolyse (Neurath, 1964) und die Inaktivierung von Proteinasen durch spezifische Inhibitoren (Laskowski & Kato, 1980). Diese Regulationsmechanismen sorgen für eine räumliche und zeitliche Begrenzung der Proteinase-wirkung.

B. 2. Kallikreine als Bestandteile proteolytischer Systeme

Kallikrein-Kinin-Systeme als Prototypen komplexer proteolytischer Systeme wurden vor mehr als 50 Jahren von Frey, Werle und Kraut entdeckt und untersucht (Frey et al., 1968). Sie kommen in Plasma, Sekreten und Geweben von Vertebraten vor (Geiger, 1981). Die regulatorischen Enzyme dieser Systeme sind die Kallikreine, die zur Klasse der Serinproteinase mit Trypsin-ähnlicher Spezifität gehören. Sie werden durch limitierte Proteolyse ihrer Zymogene aktiviert und durch spezifische Proteinaseinhibitoren inaktiviert. Zu ihren natürlichen Substraten gehören die Kininogene, die hochmolekularen Vorstufen der Kinine.

Nach ihrem Vorkommen unterscheidet man zwei Typen von Kallikreinen: (i) die Gewebekallikreine (EC 3.4.21.35) mit einem Molekulargewicht (relative Molekularmasse, M_r) von 30 000 - 35 000, die vor allem in Drüsen (Pankreas, Speicheldrüse, Prostata) vorkommen und (ii) die Plasmakallikreine (EC 3.4.21.34) mit einem Molekulargewicht von ca. 80 000, die ausschließlich im Blut gefunden werden. Die Gemeinsamkeit von Gewebs- und Plasma-

kallikreinen beschränkt sich auf ihre Substratspezifität für Kininogene; dagegen unterscheiden sie sich beträchtlich in ihren physiologischen Funktionen, ihren immunologischen Eigenschaften und ihrer Kontrolle durch Inhibitoren. Sie stellen damit zwei unterschiedliche Subtypen von Proteinasen dar.

Die wichtigsten physiologischen Substrate der Gewebskallikreine sind niedermolekulares Kininogen (Low Molecular Weight Kininogen, kurz LMW Kininogen) mit einem Molekulargewicht von 68 000 und hochmolekulares Kininogen (High Molecular Weight Kininogen, kurz HMW Kininogen) mit einem Molekulargewicht von ca. 110 000. Die vielseitigen Effekte des daraus freigesetzten Dekapeptids Kallidin (Lysyl-Bradykinin) werden durch zelluläre Rezeptoren vermittelt. Zu den wichtigsten Wirkungen des Kallidins gehören die Erhöhung der Gefäßpermeabilität, die Blutdrucksenkung durch Erweiterung von Arteriolen, die Kontraktion der glatten Muskulatur von Darm, Uterus und Bronchien und die Stimulation der zellulären Glucoseaufnahme in den Muskel (Johnson, 1979).

Plasmakallikreine setzen dagegen das Nonapeptid Bradykinin aus LMW und HMW Kininogen frei, das prinzipiell die gleichen Effekte wie Kallidin zeigt. Plasmakallikreine sind darüber hinaus noch an der Blutgerinnungskaskade sowie an weiteren physiologischen Regulationssystemen beteiligt (s. B.4.).

B. 3. Molekulare Parameter von Plasmakallikrein

Humanes Plasmakallikrein wird als Präproenzym in der Leber synthetisiert (Chung et al., 1986) und nach posttranslationaler Modifikation ins Plasma sezerniert. Dort zirkuliert es in Form seines inaktiven Proenzym im Komplex mit HMW Kininogen (Mandle et al., 1976). Die Plasmakonzentration von Prokallikrein^{*)} beim Menschen beträgt 40 - 50 mg/l. Prokallikrein ist ein einkettiges Glykoprotein (ca. 15 % Kohlenhydratanteil), das in zwei Varianten mit den Molekulargewichten 88 000 und 85 000 vorkommt, die sich vermutlich im Kohlenhydratanteil unterscheiden (Heimark & Davie, 1981). Durch isoelektrische Fokussierung können sogar sieben Varianten isoliert werden, die jedoch keine funktionellen Unterschiede zeigen. Die isoelektrischen Punkte liegen zwischen pH 8.6 und 9.5 (Hojima et al., 1985). Durch Aktivierung mit

^{*)} Das Proenzym wird im folgenden als "Prokallikrein" bezeichnet, um eine eindeutige Unterscheidung zum Präproenzym (Proenzym mit Signalpeptid) zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu ist in der Literatur die Bezeichnung "Präkallikrein" (bzw. englisch "prekallikrein") üblich.

Faktor XIIa (Hageman Faktor) wird Prokallikrein in eine Zwei-Ketten-Form überführt (Mandle & Kaplan, 1977). Die leichte Kette (M_r 36 000 bzw. 33 000), die vom C-Terminus des Proenzyms stammt, beinhaltet das aktive Zentrum der Proteinase. Sie ist über eine Disulfidbrücke mit der schweren Kette (M_r 52 000) verbunden, die vom N-Terminus des Proenzyms stammt. Die schwere Kette enthält die Bindungsstelle für HMW Kininogen (s. B.4.1.) und ist für die Funktion des Plasmakallikreins in der Gerinnungsaktivierung erforderlich (van der Graaf et al. 1982).

Die Primärstruktur von Prokallikrein wurde durch Sequenzanalyse der cDNA von Chung et al. (1986) bestimmt (vgl. Abb. 1).

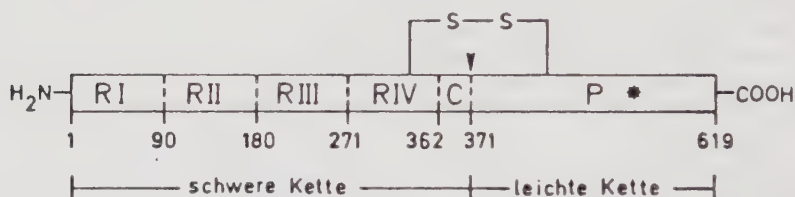


Abb. 1. Schematische Struktur von Plasmakallikrein

Die Ziffern geben die Positionen der Aminosäuren in der Sequenz von Plasmakallikrein an. R I-IV: Repetitive Einheiten der schweren Kette; C: Verbindungspeptid; P: Proteasen-Einheit; *: aktives Zentrum; ▼: Spaltstelle für Faktor XIIa; -S-S-: Disulfidbrücke.

Danach besteht das Molekül aus 619 Aminosäuren, die ein Molekulargewicht von 69 000 ergeben (mit 15 % Kohlenhydratanteil errechnet sich ein wahres Molekulargewicht von ca. 80 000). Bei der Aktivierung zum Kallikrein wird eine Arg-Ile-Bindung gespalten, wobei die leichte Kette mit 248 Aminosäuren und die schwere Kette mit 371 Aminosäuren entstehen. Die leichte Kette mit dem aktiven Zentrum ist homolog zu den Trypsin-ähnlichen Proteinasen. Die schwere Kette besteht aus vier repetitiven Einheiten von je 90 bzw. 91 Aminosäuren, die untereinander homolog sind und außer mit Faktor XI (Fujikawa et al., 1986) keine Ähnlichkeit mit bisher bekannten Proteinsequenzen aufweisen. Die neun C-terminalen Aminosäuren der schweren Kette werden als Verbindungspeptid ("connecting region") bezeichnet, an dessen C-terminalem Ende die Spaltstelle für Faktor XIIa lokalisiert ist. Die hohe Homologie von Plasmakallikrein mit Faktor XI (58 % Identität), weist auf eine enge phylogenetische Verwandtschaft der beiden Proteine hin. - Die funktionelle Charakterisierung der

Plasmakallikrein-Domänen ist (mit Ausnahme der Proteasen-Domäne) noch nicht durchgeführt worden; ein erfolgversprechender Ansatz dafür wäre die Herstellung von domänen-spezifischen monoklonalen Antikörpern und die Untersuchung ihrer Interferenz mit biologischen Funktionen des Proteins.

B. 4. Physiologische Funktionen von Plasmakallikrein

B. 4.1. Kontaktphasenaktivierung

Plasmakallikrein und HMW Kininogen sind integrale Bestandteile der endogenen Gerinnungskaskade, die durch Kontakt des Blutes mit negativ geladenen Oberflächen ("Kontaktphase") in Gang gesetzt wird (Heimark et al., 1980). Die Kontaktphasenaktivierung steht am Anfang eines proteolytischen Kaskadensystems, bei dem in mehreren gekoppelten Reaktionen inaktive Proenzyme zu aktiven Proteinasen aktiviert werden (Abb. 2).

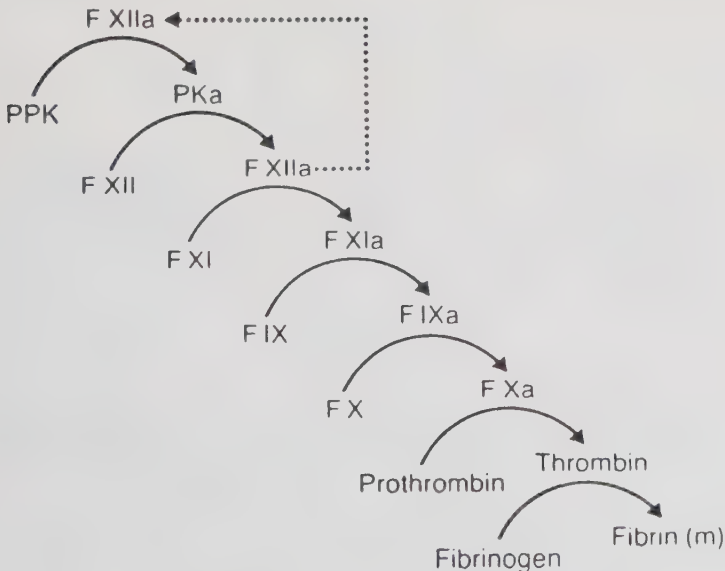


Abb. 2. Schema der endogenen Gerinnungskaskade

F: Gerinnungsfaktor; F a: aktivierter Gerinnungsfaktor;
 PPK: Plasmaprokallikrein; PKa: Plasmakallikrein; Fi-
 brin(m): monomeres Fibrin

Den Mechanismus der Kontaktphasenaktivierung stellt man sich heute wie folgt vor: bei Verletzung eines Blutgefäßes werden subendotheliale Oberflächen exponiert, die eine negative Ladung tragen. Prokallikrein und Faktor XI, die als inaktive Proenzyme in Form nicht-kovalenter Komplexe mit HMW Kininogen im Plasma zirkulieren (Thompson et al. 1977), werden über die sogenannte Histidin-reiche Region des Kininogens, die neben Histidin noch zahlreiche positiv geladene Lysyl- und Arginylgruppen besitzt (Lottspeich et al., 1985), an die Kontaktphase gebunden. Da Faktor XII ebenfalls an diese Oberfläche binden kann, kommt es zu einer lokalen Konzentrierung der Kontaktphasenfaktoren (Faktor XII, Faktor XI, Prokallikrein und HMW Kininogen) am Ort der Läsion (Abb. 3). In der Folge kommt es zu einer wechselseitigen Aktivierung von Prokallikrein und Faktor XII. Der dabei entstehende Faktor XIIa aktiviert dann Faktor XI zu Faktor XIa, der schließlich Faktor IX (antihämophiler Faktor B) und damit die weitere Gerinnungskaskade bis zur Thrombusbildung aktiviert (Kaplan, 1979).

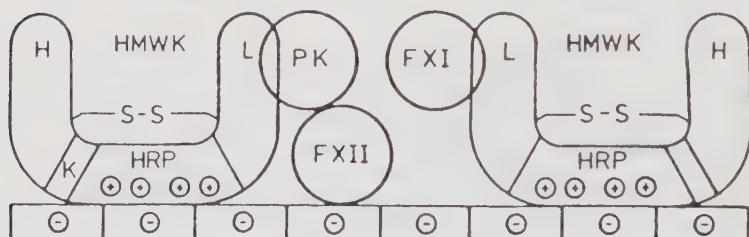


Abb. 3. Lokale Assemblierung der Kontaktphasenfaktoren auf negativ geladenen Strukturen
 PK: Plasmakallikrein; F XII (XI): Gerinnungsfaktor XII (XI); HMWK: HMW Kininogen; H: schwere Kette; K: Kinin; HRP: Histidin-reiches Peptid; L: leichte Kette

Die molekularen Mechanismen der Assemblierung von Gerinnungsfaktoren sind nur zum Teil bekannt; z.B. sind die Interaktionen von HMW Kininogen und Plasmakallikrein nur wenig charakterisiert. Insbesondere liegen keine detaillierten Informationen zu den HMW Kininogen-bindenden Regionen auf Plasmakallikrein und Faktor XI vor. Die von Thompson et al. (1979) publizierten Affinitätskonstanten für die Komplexbildung mit HMW Kininogen (4.2×10^8 für Plasmakallikrein bzw. 3.4×10^7 für Faktor XI) deuten auf eine hohe Affinität der Komplexpartner hin.

B. 4.2. Interaktionen von Plasmakallikrein mit weiteren regulatorischen Systemen

Für Plasmakallikrein werden folgende Wirkungen in anderen Enzymkaskaden postuliert:

1. Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin und damit Induktion der Fibrinolyse (Mandle & Kaplan, 1977);
2. Aktivierung des Komplementsystems durch Spaltung der Komplementfaktoren C1r und C1s, C3-Convertase und C5 (Cooper et al., 1979; DiScipio, 1982; Wiggins et al., 1981);
3. Aktivierung von Prorenin zu Renin und damit Einfluß auf die Blutdruckregulation über Angiotensin (Rumpf et al., 1980).

Die physiologische Bedeutung dieser Plasmakallikreinwirkungen ist noch nicht ausreichend belegt. Abb. 4 faßt die postulierten Interaktionen von Kallikrein mit verschiedenen regulatorischen Systemen schematisch zusammen; sämtliche Effekte beruhen auf der limitierten Proteolyse von Proteinen (meist Proteasen) durch Kallikrein.

BLUTGERINNUNG

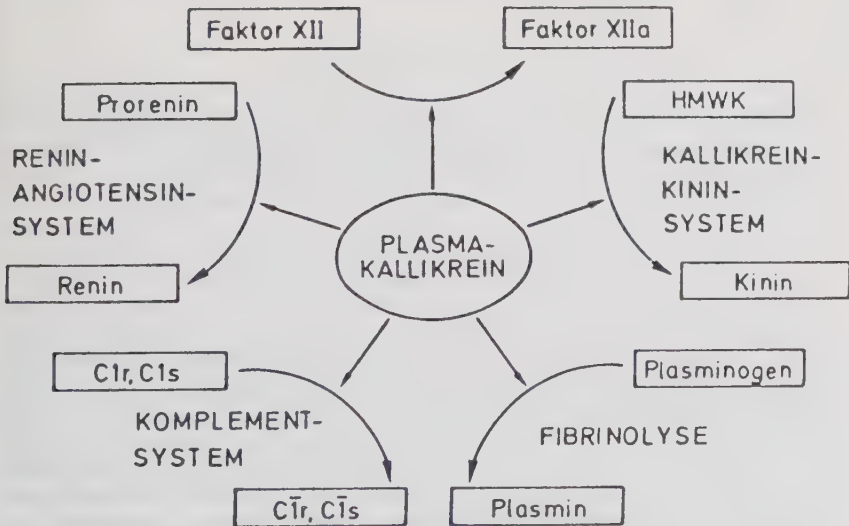


Abb. 4. Interaktionen von Plasmakallikrein mit regulatorischen Systemen

HMWK: HMW Kininogen; C1r, C1s: C1-Esterase; C1r, C1s: aktivierte C1-Esterase

Eine Prokallikrein-Defizienz ("Fletcher trait") wurde erstmals von Hathaway et al. (1965) beschrieben, der verantwortliche Faktor von Wuepper (1973) als Prokallikrein identifiziert. Die Patienten fallen durch eine verlängerte partielle Thromboplastinzeit auf und sind ansonsten asymptomatisch.

B. 5. Kontrolle von Plasmakallikrein durch Inhibitoren

B. 5.1. Plasmatische Inhibitoren von Plasmakallikrein

Die Inhibition von aktiviertem Plasmakallikrein wird im wesentlichen von zwei plasmatischen Proteinaseinhibitoren ausgeführt: $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor und α_2 -Makroglobulin. $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor ist bei der Inaktivierung von größerer physiologischer Bedeutung; er inaktiviert 50 - 84 % des aktivierten Plasmakallikreins, während α_2 -Makroglobulin nur 16 - 35 % bindet (van der Graaf et al., 1983; Harpel et al., 1985). Antithrombin III, α_1 -Proteinase-Inhibitor und α_2 -Antiplasmin sind ebenfalls in der Lage, Plasmakallikrein zu inhibieren, spielen aber unter physiologischen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle.

B. 5.2. Charakterisierung von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor

$\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor ist ein Glykoprotein (35 % Kohlenhydratanteil) mit einem apparenten Molekulargewicht von 104 000 (Haupt et al., 1970). Hauptsyntheseort ist die Leber (Johnson et al., 1971); die Plasmakonzentration beträgt ca. 200 mg/l (Harpel, 1976). Die Primärstruktur wurde durch Bock et al. (1986) ermittelt. Homologien zu anderen Serinproteinase-Inhibitoren weisen $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor als typisches Mitglied der Serpin-Familie aus.

$\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor ist der einzig bekannte Inhibitor der Komplementfaktoren $\text{C}\bar{\text{I}}\text{r}$ und $\text{C}\bar{\text{I}}\text{s}$ (Sim et al., 1979). Darüber hinaus spielt er eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Kontaktphasenaktivierung als Hauptinhibitor von Plasmakallikrein (Harpel et al., 1985) und Faktor XIIa (Pixley et al., 1985). Weitere von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor inhibierte Proteinasen sind Faktor XIa (Forbes et al., 1970) und Plasmin (Harpel & Cooper, 1975). Eine kongenitale $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Defizienz äußert sich im sogenannten "hereditären angioneurotischen Ödem" (Donaldson & Evans, 1963). Ursachen für die Odembildung dürften die fehlende Inhibierung des Komplementsystems mit einer überschießenden Produktion an vasoaktiven Substanzen und die "unkontrollierte" Kontaktphasenaktivierung mit sekundär erhöhter Kininfreisetzung sein (Donaldson et al., 1977; Schapira et al., 1983).

B. 5.3. Reaktion von Plasmakallikrein mit Cl^- -Inhibitor

Plasmakallikrein reagiert mit Cl^- -Inhibitor unter Bildung eines kovalenten Komplexes mit einem Molekulargewicht von 185 000. Der Befund, daß bei Kallikreinüberschuß neben dem Enzym-Inhibitor-Komplex noch ein modifizierter, inaktiver Cl^- -Inhibitor (M_r 94000) entsteht, weist darauf hin, daß der Inhibitor bei der Komplexbildung unter Abspaltung eines Peptids modifiziert wird (van der Graaf et al., 1983; s. Abb. 5). Ein ähnlicher Inhibitionsmechanismus ist bei anderen plasmatischen Inhibitoren von Serinproteinasen, z.B. α_1 -Proteinase-Inhibitor, Antithrombin III und α_2 -Antiplasmin im Detail aufgeklärt worden (Travis & Salvesen, 1982).

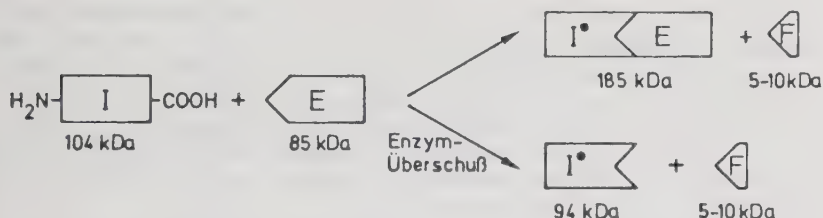


Abb. 5. Hemmechanismus von Cl^- -Inhibitor (dargestellt am Beispiel der Hemmung von Plasmakallikrein)

I: Cl^- -Inhibitor; E: Enzym; I^* : modifizierter Inhibitor;
F: freigesetztes C-terminales Fragment des Inhibitors

B. 6. Quantifizierung von Plasmakallikrein

Die Quantifizierung von Plasmakallikrein ist von klinischer Bedeutung bei Erkrankungen, die mit einer Aktivierung des Gerinnungssystems einhergehen (z.B. disseminierte intravasale Gerinnung, Polytrauma). Dafür stehen zwei Testprinzipien zur Verfügung: (i) Bestimmung der Enzymaktivität mit synthetischen Substraten und (ii) immunologische Tests wie radiale Immundiffusion oder Radioimmunoassay (Fisher et al., 1982, Saito et al., 1978). Da aktives Plasmakallikrein durch Inhibitoren im Plasma rasch inaktiviert wird, ist eine direkte Bestimmung der freien Proteinase mit enzymatischen Tests nicht möglich. Nach in vitro-Aktivierung des Kontaktphasensystems kann jedoch das gesamte aktivierbare Prokallikrein gemessen werden. Immunologische Tests mit polyklonalen Antikörpern differenzieren nicht zwischen Kal-

likrein, Prokallikrein und Kallikrein-Inhibitor-Komplexen; selektive monoklonale Antikörper stehen derzeit noch nicht zur Verfügung (Lewin et al., 1983). Eine Möglichkeit, die Aktivierung von Plasmakallikrein direkt zu messen, bietet z.B. die Quantifizierung des Plasmakallikrein-C $\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplexes.

B. 7. Aufgabenstellung und Ziele

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Struktur-Funktionsbeziehungen am Plasmakallikrein mit Hilfe monoklonaler Antikörper zu analysieren. Dazu sollte eine möglichst große Anzahl von monoklonalen Antikörpern, die unterschiedliche Epitope auf dem Ziel-Antigen erkennen, generiert werden und ihre Interferenz mit physiologischen Funktionen von Plasmakallikrein analysiert werden. Eine besondere Bedeutung kam dabei der Bindungsregion für die Assoziation von Plasmakallikrein mit HMW Kininogen zu, gegen die monoklonale Antikörper gewonnen werden sollten. Darüber hinaus sollte mit Hilfe der gewonnenen Antikörper ein immunologischer Test zur Erfassung des Plasmakallikrein-C $\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplexes etabliert werden, um damit aktiviertes Plasmakallikrein quantifizieren zu können.

Im einzelnen waren folgende Aufgaben zu bearbeiten:

- Isolierung von Plasma(pro)kallikrein und C $\bar{\text{I}}$ -Inhibitor;
- Produktion monoklonaler Antikörper gegen Plasmakallikrein, C $\bar{\text{I}}$ -Inhibitor und den Plasmakallikrein-C $\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplex;
- Charakterisierung der Antikörper gegen Plasmakallikrein und Zuordnung zu strukturellen und funktionellen Molekülbereichen;
- Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Quantifizierung des Plasmakallikrein-C $\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplexes im Plasma.

C. MATERIAL UND METHODEN

C. 1. Material

C. 1.1. Geräte

- Proteinisolierung

Peristaltische Pumpe, Typ Perpex 10200 (mit austauschbaren Ge-
trieben); Durchflußphotometer, Typ 2238 (Extinktionsmessung bei
280 nm); Ultrorac Fraktionssammler, Typ 7000; Schreiber, Typ
2210 (Fa. LKB, München)

Zentrifuge Centrikon H-401 (Fa. Kontron, Eching)

- Hybridomatechnik

Airflow, Clean Air, Typ DLF/BSS6 (Fa. Schrader, Göttingen)

Zentrifuge, Modell 1200 (Fa. Hettich, Tuttlingen)

Invert-Mikroskope (Fa. Zeiss, Oberkochen)

Begasungs-Brutschrank, Typ B 5060 EK/CO₂ (Fa. Heraeus, Hanau)

Wasserbad UL 30 (Fa. Memmert, Schwabach)

8-Kanal-Pipette (Fa. Dynatech, Denkendorf)

- Enzymimmunoassay

Micro-ELISA-Photometer MR 580 (Fa. Dynatech, Denkendorf)

Titertek Mikrotiterplatten-Waschgerät Typ 120; Microdispenser

Autodrop (Fa. Flow Laboratories, Meckenheim)

Präzisionsbrutschrank B 53 (Fa. Binder, Tuttlingen)

Diluter Microlab (Fa. Hamilton, Darmstadt)

8-Kanal-Pipette (Fa. Dynatech, Denkendorf)

- Western Blot und Immunoprint

Transblotkammer Transphor mit Spannungsgerät, Typ 2005; Thermo-
stat, Typ 2219 (Fa. LKB, München)

Inkubationsschüttler (Fa. Heidolph, Kelheim)

- Immunelektrophorese

Horizontaltisch; Stanzvorrichtung; Schablone; Multiphor-Elektro-
phoresekkammer, Typ 2117; Spannungsgerät, Typ 2197 (Fa. LKB,
München)

- SDS-Elektrophorese

Flachgelelektrophoresekkammer (vertikales Gelelektrophorese-Sys-
tem), Nr. 1070, Modell V 161 (Fa. BRL, Neu Isenburg)

Spannungsgerät, Typ 2197 (Fa. LKB, München)

- Enzymtests

Küvettenwechselautomat, Typ 2705 mit Enzymrechner, Typ 6452 (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Thermostat, Typ NB-D8/17 (Fa. Meßgerätewerk, Lauda/Tauber)

- Weitere Geräte

γ -Counter MR 1302 (Fa. Kontron, Eching)

Coagulometer (mit Inkubator) nach Schnitger und Gross (Fa. Amelung, Lemgo)

Spektral-Photometer PM 2 DL (Fa. Zeiss, Oberkochen)

Computer QX 10, Plotter HI-80 (Fa. Epson, Düsseldorf)

C. 1.2. Substanzen, Materialien

- Proteinisolierungen

Diisopropyl-fluorophosphat (DFP), Nr. D-0879; Iodacetamid, Nr. I-6125 (Fa. Sigma, Deisenhofen)

Dithiothreitol (DTT), Nr. 161-0611 (Fa. Bio-Rad, München)

CNBr-Sephadex 4 B, Nr. 17-0690-01; QAE-Sephadex A-50, Nr. 17-0200-02; Con A-Sephadex, Nr. 17-0440-01; DEAE-Sephacel, Nr. 17-0500-01 (Fa. Pharmacia, Freiburg)

Cohn-Fraktion IV-1 (Fa. Cutter Laboratories, Berkeley, USA)

Humanplasma (Fresh Frozen Plasma) (Bayer. Rotes Kreuz, zur Verfügung gestellt von der Blutbank der Chirurg. Klinik, München)

Trypsininhibitor aus Sojabohnen (SBTI), Nr. 24020 (Fa. Merck, Darmstadt)

Antikörper (aus Schaf) gegen Human-IgG (Dr. R. P. Linke, Institut f. Immunologie, München)

β -Faktor XIIa (Dr. N. Heimbürger, Fa. Behring, Marburg)

Dialysierschläuche Visking 8/32, Nr. 44104 bzw. 20/32, Nr. 44110 (Fa. Serva, Heidelberg)

- weitere proteinchemische Methoden

D-Biotin-N-hydroxysuccinimidester, Nr. 732494 (Fa. Boehringer, Mannheim)

Dimethylsulfoxid (DMSO), Nr. 9678 (Fa. Merck, Darmstadt)

Iodogen (1,3,4,6-Tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril), Nr. 28600 (Fa. Pierce, Rodgau)

Natriumiodid (^{125}I), Nr. IMS 30 (Fa. Amersham, Braunschweig)

PD-10-Gelfiltrationssäulen (Sephadex G-25M), Nr. 17-0851-01 (Fa. Pharmacia, Freiburg)

- Antikörperproduktion

Freund'sches Adjuvans, komplett; Freund'sches Adjuvans, inkomplett (Fa. Behring, Marburg)

Äther zur Narkose (Fa. Hoechst, Frankfurt)

Rosewell Park Memorial Institute-(RPMI)-Medium 1640 (mit NaHCO_3 , ohne Glutamin), Nr. 1215; Fötales Kälberserum (FCS), Nr. 0115; Penicillin-Streptomycin (100fach), Nr. 2212; Natrium-Pyruvat 100 mM (100fach), Nr. 0473 (Fa. Seromed, Berlin)

Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-(HAT)-Konzentrat (50fach), Nr. 644579; Hypoxanthin-Thymidin-(HT)-Konzentrat (50fach), Nr. 623091; L-Glutamin 200 mM (100fach), Nr. 210277 (Fa. Boehringer, Mannheim)

Polyethylenglykol PEG 4000, Nr. 33136 (Fa. Serva, Heidelberg)
Pristan (2,6,4,10-Tetramethylpentadecan), Nr. T2280-2 (Fa. Aldrich, Steinheim)

Myelomzellen X63/AG 8.653 (Dr. R. P. Linke, Institut f. Immunologie, München)

Mehrfachkulturschalen: Cluster 96, Nr. 3596; Cluster 24, Nr. 3524; Cluster 6, Nr. 3506; Zellkulturflaschen: 250 ml, Nr. 3075; 650 ml, Nr. 3150; Serologische Pipetten: 1 ml, Nr. 4001; 5 ml, Nr. 4051; 10 ml, Nr. 4101 (Fa. Tecnomara, Fernwald)

Zellkulturflaschen 50 ml, Nr. 690160 (Fa. Greiner, Nürtingen)
Röhrchen, konischer Boden, 50 ml, Nr. 2070 (Fa. Falcon, Heidelberg)

- Enzymimmunoassay

Rinderserumalbumin (RSA), Nr. 735108; 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)) (ABTS), Nr. 102946 (Fa. Boehringer, Mannheim)

Avidin, Nr. A9275; biotinylierte Peroxidase, Nr. P9272 (Fa. Sigma, Deisenhofen)

Antisera (aus Kaninchen) gegen Maus-Immunglobulin-Subtypen (Fa. Bayer Diagnostik, München)

Humanplasma (Mischung der Plasmen zweier gesunder Spender)

SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat),

Nr. 17-0458-01 (Fa. Pharmacia, Freiburg)

ELISA-Platten, Typ M 129 B (Kobalt-bestrahlte Immunolon-Platten, F-Form (Fa. Dynatech, Denkendorf)

- Western Blot und Immunoprint

Nitrocellulose (0.45 um Porengröße), Nr. 401196 (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel)

4-Chlor-1-naphthol, Nr. C8890 (Fa. Sigma, Deisenhofen)

Protein A, Nr. 775177 (Fa. Boehringer, Mannheim)

X-Omat AR-Film, 13x18 cm (Fa. Kodak, Rochester, USA)

- SDS-Elektrophorese

Natriumdodecylsulfat (SDS), Nr. 20760 (Fa. Serva, Heidelberg)

Dithiothreitol (DTT), Nr. 161-0611 (Fa. Bio-Rad, München)

Serva Blau R250, Nr. 35051 (Fa. Serva, Heidelberg)

Markerproteine für SDS-Gele: Myosin (schwere Kette, 200 kDa), β -Galactosidase (116 kDa), Phosphorylase B (92 kDa), Rinderse-rumalbumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (31 kDa), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (21.5 kDa), Lysozym (14 kDa) (Fa. Bio-Rad, München)

- weitere Substanzen und Materialien

Agarose L, Nr. 252014C (Fa. Behring, Marburg)

S-2302 (Fa. Kabi, Stockholm, Schweden)

PTT-Reagenz (Kaolin-Suspension in Cephalinlösung), Nr. 126551 (Fa. Boehringer, Mannheim)

biotinylierter monoklonaler Antikörper gegen HMW Kininogen (J. Kaufmann, Abt. Klin. Chemie, München)

Antiserum (aus Ziege) gegen Human-Faktor XI (Dr. Karger, Fa. Behring, Marburg)

Maus-IgG, Nr. I-5381; Prokallikrein-Mangelplasma, Nr. B-6765 (Fa. Sigma, Deisenhofen)

pathologische Plasmen: Polytraumapatienten (Dr. Kellermann, Klinikum Großhadern); DIC- und Bypasspatienten (Prof. Schramm, 1. Med. Univ.-Klinik, München)

Polystyrol-ELISA-Röhrchen (Dr. W. Rautenberg, Fa. Merck, Darmstadt)

Coagulometerröhrchen (Fa. Plazotta, München)

Alle weiteren Chemikalien wurden von Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Sigma, Deisenhofen in p.a.-Qualität bezogen.

C. 2. Methoden

C. 2.1. Proteinchemische Methoden

C. 2.1.1. Isolierung von Plasmakallikrein durch Affinitätschromatographie (Sampaio et al., 1974; van der Graaf et al., 1982)

Lösungen:

- A 0.1 M NaCl, 3 mM NaN_3 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
- B 0.5 M Benzamidin, 0.3 M EDTA, 5 mg/ml Polybren (Inhibitorcocktail)
- C 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, pH 8.0
- D 0.5 M NaCl, 1 mM Benzamidin, 3 mM NaN_3 , 0.183 M Natriumacetat, pH 5.3
- E 0.2 M Glycin-HCl, pH 2.2
- F 1.5 M Tris-HCl, pH 8.0

Plasmaprocallikrein wurde aus Cohn-Fraktion IV-1 (Cohn et al., 1946) nach der Methode von Sampaio et al. (1974) mit folgenden Modifikationen isoliert:

Procallikrein wurde mit 0.06 M NaCl aus dem Ausgangsmaterial extrahiert und durch Säurebehandlung (pH 2.0) aktiviert. Nach der Aktivierung und Neutralisierung wurde Plasmakallikrein an SBTI-Sepharose (137 mg SBTI, gekoppelt an 15 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B, s. C.2.1.7.) gebunden und mit 1 M Benzamidin-HCl, pH 7.5, eluiert. Das Eluat wurde gegen Lösung D dialysiert und über eine anti-(Human-IgG)-IgG-Sepharose (58 mg anti-(Human-IgG)-IgG/1 g Sepharose, s. C.2.1.8.) und eine anti-Albumin-IgG-Sepharose (75 mg anti-Albumin-IgG/1 g Sepharose) rezykliert. Der Durchlauf, der Plasmakallikrein enthielt, wurde über HMW-Kininogen-Sepharose (46 mg/3 g) rezykliert. Gebundenes Plasmakallikrein wurde mit 3 M NaSCN von der Säule eluiert (van der Graaf et al., 1982), gegen Lösung A dialysiert und mittels Vakuumdialyse auf ca. 1 mg/ml konzentriert. Das Material wurde bei -70°C gelagert.

C. 2.1.2. Isolierung von Plasmaprocallikrein durch Immunaффinitätschromatographie

Lösungen: siehe C.2.1.1.

Die gesamte Isolierung wurde in Plastikgefäßen durchgeführt, um eine Aktivierung des Kontaktphasensystems durch negativ gela-

dene Oberflächen (Glas) auszuschließen.

Ausgangsmaterial war Humanplasma (Fresh Frozen Plasma; 200 - 300 ml pro Isolierung), dem sofort nach dem Auftauen (37°C) ein Inhibitorcocktail (Lösung B) im Verhältnis 1:100 zugesetzt wurde, um eine Aktivierung des Prokallikreins zu verhindern. Das meist trübe, lipämische Plasma wurde mit BaSO_4 (100 mg/ml Plasma) 20 min bei 25°C gerührt. Nach Abzentrifugieren (15 min, 3000 g) und Filtrieren über einen Faltenfilter wurde das geklärte Plasma 2 h bei 25°C mit dem gleichen Volumen eines QAE-Sephadex A-50-Gels (äquilibriert in Lösung B + Lösung C, 1:100) gerührt. Die Suspension wurde über einen Büchner-Trichter filtriert und mit ca. 200 ml Lösung C nachgewaschen. Das Filtrat wurde gegen Lösung D dialysiert und anschließend über HMW Kininogen-Sepharose (s. C.2.1.1) rezykliert. Nach Waschen des Gels mit Lösung D wurden gebundene Proteine mit 3 M NaSCN eluiert und gegen Lösung A dialysiert. Das Eluat enthielt neben Prokallikrein und Faktor XI noch IgG und Spuren von Albumin, die durch Immunadsorption an anti-(Human-IgG)-IgG-Sepharose und anti-Albumin-IgG-Sepharose (s. C.2.1.1.) entfernt wurden. Danach folgte eine Immunaффinitätschromatographie an anti-Plasmakallikrein-Sepharose (polyklonale Antikörper, 19 mg/1 g). Die ungebundene Fraktion dieser Säule enthielt Faktor XI. Das gebundene Prokallikrein wurde mit Lösung E eluiert, zur raschen Neutralisierung in Lösung F (1.5 ml/6 ml Eluat) aufgefangen, gegen Lösung A dialysiert und mittels Vakuumdialyse auf ca. 1 mg/ml konzentriert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Präparationen, die ausschließlich für proteinchemische oder immunologische Untersuchungen bestimmt waren, wurde nach jedem Reinigungsschritt DFP zugesetzt (Endkonzentration 1 mM), um die Aktivierung des Prokallikreins möglichst vollständig zu unterdrücken.

C. 2.1.3. Isolierung der leichten Kette von Plasmakallikrein (van der Graaf et al., 1982)

Lösungen: siehe C.2.1.1.

4 mg Prokallikrein in Lösung A wurden mit 26.6 µg β -Faktor XIIa*) (molares Verhältnis Faktor XII zu Prokallikrein 1:50) aktiviert (90 min, 37°C). Aktives Kallikrein wurde mit Dithio-

*) β -Faktor XIIa ist ein Fragment (M_r 28 000) von aktiviertem Faktor XII (α -Faktor XIIa, M_r 80 000), das durch Trypsin-Spaltung erhalten wird und die enzymatisch aktive leichte Kette enthält.

threitol (DTT; 27 µg/mg Kallikrein) reduziert (1 h, 37°C, unter Stickstoff) und mit Iodacetamid (42 µg/mg Kallikrein) carboxymethyliert (1 h, 25°C, unter Stickstoff, Lichtausschluß). Das Material wurde gegen Lösung A dialysiert und über anti-Kallikrein-Sepharose (PK 1: monoklonaler Antikörper gegen die schwere Kette von Kallikrein - 56 mg/1 g) rezykliert. Die Elution wurde wie bei der immunaffinitätschromatographischen Reinigung von Plasmaprokalikrein durchgeführt. Der Durchlauf enthielt die gereinigte leichte Kette, während das Eluat die schwere Kette und nicht vollständig reduziertes Kallikrein beinhaltete. Dialyse, Konzentration und Lagerung erfolgten wie unter C.2.1.1. angegeben.

C. 2.1.4. Isolierung von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor (Sim & Reboul, 1981)

Anfänglich wurde $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor nach der Methode von Sim & Reboul (1981) aus Humanplasma (Fresh Frozen Plasma) gereinigt. Nachdem spezifische Antikörper gegen $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor zur Verfügung standen (s. D.6.), wurde die Methode variiert: statt Affinitätschromatographie an Con A-Sepharose wurde eine Immunaffinitätschromatographie an anti- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-IgG-Sepharose (53 mg anti- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-IgG/1 g) eingesetzt (Applikation und Elution analog C.2.1.2.). Die gesamte Isolierung wurde in Plastikgefäßen durchgeführt (vgl. C.2.1.2.).

C. 2.1.5. Isolierung des Plasmakallikrein- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplexes

Lösungen: siehe C.2.1.1.

Der Komplex aus Plasmakallikrein und $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor wurde präparativ dargestellt und gereinigt.

4.2 mg Prokalikrein in Lösung A wurden mit 29.4 µg β -Faktor XIIa (molares Verhältnis Prokalikrein: β -Faktor XIIa 1:50) aktiviert (90 min, 37°C). Anschließend wurden 16 mg $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor zugegeben und die Mischung 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von Lösung B (1:100) wurde der Komplex durch Immunaffinitätschromatographie an anti-Kallikrein-IgG-Sepharose (PK 1: monoklonaler Antikörper gegen die schwere Kette von Plasmakallikrein; 56 mg/1 g) und anti- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Sepharose (s. C.2.1.4.) aus dem Reaktionsgemisch isoliert.

C. 2.1.6. Isolierung von Antikörpern

a) Reinigung von spezifischen Antikörpern durch Immunselektion
(Müller-Esterl, 1986)

Lösungen:

- PBS 0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 6.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 3 mM NaN_3 , pH 7.2
- NaSCN-Lösung 0.2 M NaSCN, pH 5.8
- Glycin-Puffer 0.2 M Glycin-HCl, pH 2.2
- Tris-Puffer 1.5 M Tris-HCl, pH 8.0

Eine geeignete Menge Antiserum (i.a. 5 - 10 ml) bzw. Ascites (i.a. 1 ml) wurde mit DFP (Stammlösung 2.5 M in Isopropanol) 30 min bei 25°C inkubiert (finale DFP-Konzentration 1 mM), um proteolytische Spaltungen durch aktivierte Serinproteinasen des Serums zu verhindern. Das Antiserum wurde dann über Nacht über das immobilisierte Antigen (s. C.2.1.7.) rezykliert. Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Proteine mit PBS eluiert. Anschließend wurde das Gel mit dem NaSCN-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine (und schwach bindende Antikörper) zu eluieren. Das Gel wurde mit PBS gespült und die spezifisch gebundenen Antikörper mit Glycin-Puffer eluiert. Zur raschen Neutralisation des Eluats wurde Tris-Puffer vorgelegt (1.5 ml/6 ml Eluat). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert. Das Gel wurde mit PBS reäquilibriert. Die Antikörper wurden mittels Vakuumdialyse auf ca. 1 mg/ml konzentriert und bei -20°C gelagert. PBS-, NaSCN- und Glycin-Fraktion wurden im indirekten ELISA auf Antikörper getestet.

Bei der Immunselektion von 1 ml Ascites war die gesamte Antikörperaktivität in der Glycinfraktion enthalten, so daß die erhaltene Antikörpermenge dem absoluten Titer an spezifischen Antikörpern entsprach.

b) Isolierung der IgG-Fraktion (Wallmark et al., 1984)

Das nachfolgende Verfahren wurde zur Isolierung größerer Antikörpermengen aus Ascites eingesetzt. Ascites wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung im Verhältnis 55:45 gemischt und 1 h bei 4°C inkubiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (30 min, 4000 g, 4°C) und in Tris-Puffer (10 mM, pH 7.5) aufgenommen. IgG wurde anschließend durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose gereinigt (Applikation in Tris-Puffer, Elution mit einem linearen Salzgradienten von 0 - 0.3 M NaCl im

gleichen Puffer). Die Antikörper wurden auf ca. 1 mg/ml konzentriert und bei -20°C gelagert.

C. 2.1.7. Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose (Cuatrecasas, 1970)

Lösungen:

- Waschlösung	1 mM HCl
- Kopplungspuffer	0.5 M NaCl, 0.1 M NaHCO_3 , pH 8.3
- Terminationspuffer	1 M Ethanolamin, pH 8.0
- Waschpuffer 1	1 M NaCl, 0.1 M Natriumacetat, pH 4.0
- Waschpuffer 2	1 M NaCl, 0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 8.0

CNBr-aktivierte Sepharose (1 g für 3.5 ml Gel) wurde mit 1 mM HCl gewaschen. Nach Einstellen von pH 8.3 mit Kopplungspuffer wurde das Gel zur Proteinlösung (dialysiert gegen Kopplungspuffer, Proteinkonzentration ca. 2 mg/ml) gegeben und unter ständiger Rotation inkubiert (2 h, 25°C). Anschließend wurde das Gel mit Kopplungspuffer auf einer Fritte gewaschen und mit Terminationspuffer unter ständiger Rotation inkubiert (2 h, 25°C). Zuletzt wurde das Gel abwechselnd mit den Waschpuffern gewaschen und war danach gebrauchsfertig. Die Lagerung erfolgte in PBS (s. C.2.1.6.) bei 4°C . In der Regel wurden 90 - 98 % des eingesetzten Proteins an das Gel gebunden.

Folgende Proteine wurden an CNBr-Sepharose gekoppelt:

SBTI	137 mg/15 g Sepharose
Plasmakallikrein	3 mg/ 1 g "
Plasmaprokallikrein	8 mg/ 1 g "
HMW Kininogen	46 mg/ 3 g "
Cl^- -Inhibitor	6 mg/ 1 g "

C. 2.1.8. Kopplung von Immunglobulinen an CNBr-aktivierte Sepharose

Lösungen: siehe C.2.1.7.

- Kopplungspuffer	0.1 M tri-Natriumcitrat-2-hydrat, pH 6.5
-------------------	--

Die Kopplung von Immunglobulinen erfolgte nach der gleichen Methode wie oben beschrieben (C.2.1.7.). Die IgG-Konzentration betrug 5 - 10 mg/ml.

Folgende Immunglobuline wurden an CNBr-Sepharose gekoppelt:

anti-Human-Albumin-IgG (Kaninchen)	75 mg/ 1 g Sepharose
anti-(Human-IgG)-IgG (Schaf)	58 mg/ 1 g "
anti-Plasmakallikrein-IgG (Kaninchen)	19 mg/ 1 g "
anti-Plasmakallikrein-IgG (PK 1, monoklonal, Maus)	56 mg/ 1 g "
anti-CI ⁻ -Inhibitor-IgG (Kaninchen)	53 mg/ 1 g "

C. 2.1.9. Biotinylierung von Proteinen (Subba Rao et al., 1983)

Lösungen:

- A 0.1 M NaHCO₃, pH 8.0
- B 1 mg/ml D-Biotin-N-Hydroxysuccinimidester in Dimethylsulf-oxid
- C 0.1 M NaCl, 0.1 M NaH₂PO₄ x H₂O, 0.1 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH 7.2

Die Proteinlösung (ca. 1 mg/ml) wurde gegen Lösung A dialysiert, mit 0.1 ml Lösung B/mg Protein 4 h bei 25°C inkubiert und anschließend gegen Puffer C dialysiert. Die Proteine wurden bei -20°C gelagert.

Folgende Proteine wurden biotinyliert:

- polyklonale und monoklonale Antikörper
- HMW Kininogen
- Prokallikrein

C. 2.1.10. ¹²⁵I-Markierung von Proteinen (Fraker & Speck, 1978)

10 µg Protein wurden in einem mit Iodogen (1,3,4,6-Tetrachloro-3α,6α-diphenylglycoluril) beschichteten Plastik-Röhrchen mit 0.125 mCi Na¹²⁵I radioaktiv markiert (Inkubationszeit 5 min). Markiertes Protein wurde in einer PD-10-Säule durch Gelfiltration von freiem Iod abgetrennt. Die spezifische Aktivität betrug 5 - 15 µCi/µg Protein.

Folgende Proteine wurden mit ¹²⁵I markiert:

- Protein A
- anti-(Maus-IgG)-IgG
- monoklonale Antikörper PK 2, PK 4, PK 6, PK 14, K 1

C. 2.2. Immunologische Methoden

C. 2.2.1. Produktion polyklonaler Antikörper

Weibliche Kaninchen der Rasse "New Zealand White Rabbits" wurden nach dem folgenden Schema immunisiert: Eine erste Injektion (Tag 1) von 75 µg Antigen in 1 ml komplettem Freund'schem Adjuvans wurde subcutan verabreicht. An den Tagen 14, 21, 28 und 38 wurden jeweils 100 µg Antigen intravenös injiziert. Der Anstieg der Serumkonzentration an spezifischen Antikörpern wurde mit einem indirekten ELISA (s. C.2.2.3.a) verfolgt. Bei ausreichendem Titer wurden die Tiere am Tag 48 entblutet. Die spezifischen Antikörper wurden durch Immunselektion (s. C.2.1.6.a) an Plasmakallkrein-Sepharose gereinigt.

C. 2.2.2. Produktion monoklonaler Antikörper (Köhler & Milstein, 1975)

Medien:

- RPMI RPMI 1640 Medium, mit NaHCO_3 (2.2 g/l)
- RPMI/10 % FCS RPMI, Natriumpyruvat (1 mM), L-Glutamin (2 mM), Penicillin/Streptomycin (100 E/100 µg/ml), 10 % FCS (finale Konzentrationen)
- HT-Medium RPMI/20 % FCS, Hypoxanthin (13.6mg/l), Thymidin (3.9 mg/l) (finale Konzentrationen)
- HAT-Medium wie HT-Medium, mit Aminopterin (0.18 mg/l)

Die Produktion monoklonaler Antikörper wurde nach der Methode von Köhler und Milstein (1975) durchgeführt. Im folgenden sind kurz die wesentlichen Schritte besprochen.

a) Immunisierung von Mäusen

Für die Immunisierung wurden 6 - 12 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse verwendet. Die Grundimmunisierung (Tag 1) erfolgte subcutan mit 50 µg Antigen in 100 µl Lösung, emulgiert in 100 µl komplettem Freund'schem Adjuvans. An den Tagen 28 und 56 wurden 30 bzw. 10 µg Antigen in inkomplettem Freund'schem Adjuvans ebenfalls subcutan injiziert. An den Tagen 42 und 70 wurde jeweils eine Probeblutung aus dem orbitalen Venenplexus abgenommen und der Titerverlauf mittels indirektem ELISA bestimmt. Bei ausreichendem Titer wurden in einem Mindestabstand von 4 Wochen nach der letzten Boosterung 50 µg Antigen in isotonomischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Fünf Tage später wurde die

Fusion durchgeführt.

b) Myelomzellen

Als Fusionspartner für die Maus-Lymphozyten wurde die Myelomzelllinie X63/AG 8.653 (non-producer, aus BALB/c) verwendet. Eine Woche vor dem Fusionstermin wurden die Zellen aufgetaut, in RPMI/10 % FCS vermehrt und auf eine Zelldichte von ca. 2×10^5 eingestellt. Für eine Fusion (ca. 10^8 Lymphozyten pro Milz) wurden in der Regel 5×10^7 Myelomzellen eingesetzt.

c) Gewinnung von Makrophagen

Makrophagen wurden aus verschiedenen Mäusestämmen durch Spülung der Peritonealkavität mit RPMI gewonnen, abzentrifugiert (10 min, 400 g, 25°C), im gewünschten Medium suspendiert und auf die Kulturplatten ausgesät (ca. 20 000 Makrophagen pro 200 µl Medium).

d) Zellfusion

Für die Fusion wurde die Maus in Ethernarkose durch cervikale Dislokation getötet und die Milz aseptisch entfernt. Die Lymphozyten wurden durch Zerkleinerung der Milz mit zwei Kanülen freigesetzt und zusammen mit den Myelomzellen zentrifugiert (10 min, 200 g, 25°C). Der Überstand wurde abgesaugt und die Fusion im Zellsediment durchgeführt.

0.5 ml einer 50 %igen Lösung von PEG 4000 in RPMI wurden innerhalb einer Minute unter Schütteln zugetropft. Die Suspension wurde 1.5 min bei 37°C inkubiert und das PEG schließlich durch Zugabe von 7.5 ml RPMI innerhalb 5 min verdünnt. Nach einer weiteren Inkubation von 10 min bei 25°C wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (10 min, 200 g, 25°C). Die Zellen wurden in HAT-Selektionsmedium suspendiert und auf drei Zellkulturplatten (in Format und Größe identisch mit ELISA-Mikrotiterplatten) ausgesät, in denen 2×10^4 Makrophagen pro Kavität vorgelegt waren.

Die Kultur der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C in Gegenwart von 5 % CO₂. Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurde das Medium gewechselt. Nach 10 Tagen wurde HAT-Medium durch HT-Medium ersetzt, das nach weiteren drei Tagen durch RPMI/10% FCS ersetzt wurde. Nach 14 Tagen wurden die Zellen im indirekten ELISA (C.2.2.3.a) auf Antikörperproduktion getestet.

e) Zellkultur und Klonierung

Als Nährmedium wurde RPMI/10 % FCS verwendet. Antikörperproduzierende Zellen wurden auf Kulturschalen mit größeren Kavitäten überführt und nach der Methode der limitierenden Verdünnung (Galfre & Milstein, 1981) mindestens dreimal subkloniert. So erhaltene Klone wurden in großen Zellkulturflaschen (200 ml Medium) für die Gewinnung monoklonaler Antikörper aus dem Nährmedium gezüchtet.

f) Ascitesproduktion

Die Produktion größerer Antikörpermengen wurde in vivo durchgeführt. Drei Monate alten BALB/c-Mäusen wurden 0.5 ml Pristan (2,6,4,10-Tetramethylpentadecan) intraperitoneal injiziert. Ein bis drei Wochen später wurden den Mäusen die Zellen einer Hybridoma-Zelllinie (ca. 10^7 Zellen pro Maus) injiziert. Die Tiere entwickelten in der Regel innerhalb einer Woche ein Plasmocytom mit Ascitesproduktion. Die Ascitesflüssigkeit wurde alle 2 - 3 Tage durch Punktion der Peritonealkavität gewonnen (5 - 50 ml pro Maus). Nach Abzentrifugieren der Zellen (2 min, 8000 g, 25°C) wurde der Ascites bei -20°C gelagert.

Der Titer an spezifischen Antikörpern wurde durch Ausbeutebestimmung bei der Immunselektion (C.2.1.6.a) ermittelt; er betrug in der Regel 2 - 10 mg/ml.

C. 2.2.3. Enzymimmunoassay (Voller, 1980)

Lösungen:

- A1 0.1 M NaCl, 2 mM Benzamidin, 0.1 M Natriumacetat, pH 5.5
- A2 0.1 M NaCl, 0.1 M NaHCO₃, pH 9.6
- B 0.15 M NaCl, 0.05 % (w/v) Tween 20, 10 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 10 mM NaH₂PO₄ x H₂O, pH 7.4
- C 2 % (w/v) Rinder-Serumalbumin (RSA) in Puffer B
- D 0.1 M Citronensäure, 0.1 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH 4.5
- E 2 % (w/v) 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)) (ABTS)
- F 0.6 % (v/v) H₂O₂

Substrat: 9.5 ml Lösung D, 0.5 ml Lösung E, 0.2 ml Lösung F

Alle Inkubationsschritte mit Ausnahme der Plattenbeschichtung wurden bei 37°C durchgeführt. Die Reagenzien wurden in Puffer C verdünnt.

a) Indirekter ELISA

Der indirekte ELISA wurde eingesetzt zur Bestimmung des Titerverlaufs bei Immunisierungen, zur Detektion Antikörper-produzierender Hybridomazellen und zur (relativen) Titerbestimmung von Zellüberständen und Ascites. Die Subtypisierung monoklonaler Antikörper wurde mit einem modifizierten indirekten ELISA unter Verwendung spezifischer anti-Subtypen-Antisera durchgeführt.

Die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurden mit 200 µl einer Antigenlösung (0.1 - 0.2 µg/ml in Puffer A1) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Platten mit Puffer B gespült und anschließend mit einer seriellen Verdünnungsreihe (2^n) der zu testenden Antikörperlösung beschickt. Nach 2 h Inkubation wurde mit Puffer B gewaschen und die Konjugatlösung (Peroxidase(POD)-markierter Antikörper gegen den ersten Antikörper, s. C.2.3.6.c) pipettiert. Nach dreistündiger Inkubation und erneutem Waschen wurde die POD-Aktivität mit ABTS/H₂O₂ detektiert. Nach einer weiteren Inkubation von 30 min wurden die Platten am Micro-ELISA-Photometer bei 405 nm vermessen. Die graphische Auswertung erfolgte im halblogarithmischen Maßstab (Abszisse: Logarithmus der Antikörperkonzentration, Ordinate: Extinktion bei 405 nm).

b) Kompetitiver ELISA

Der kompetitive ELISA fand Anwendung bei der Untersuchung der (relativen) Epitopspezifität monoklonaler Antikörper. Für die Untersuchung des Einflusses monoklonaler Antikörper auf die Bindung von Plasmakallikrein an Kininogen wurden modifizierte Formen dieses ELISAs entwickelt.

Die Durchführung des kompetitiven ELISAs war weitgehend analog dem indirekten ELISA (Punkt a). Die Mikrotiterplatten wurden mit Antigen (1.0 µg/ml in Puffer A1) beschichtet. Nach dem Waschen wurde mit einer Mischung zweier Antikörperlösungen (je 100 µl) inkubiert: Eine konstante (optimierte) Menge eines biotinylierten Antikörpers (0.03 - 0.3 µg/ml, s. C.2.1.9.) wurde mit einer Verdünnungsreihe (2^n) eines zweiten Antikörpers gemischt und auf die Platten pipettiert. Nach dreistündiger Inkubation der Mischung und Spülen der Platten folgte eine Inkubation von 30 min mit dem Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex (BAP-Komplex, s. C.2.3.6.d), anschließend wurde mit Substratlösung inkubiert (30 min).

c) Sandwich-ELISA

Zur Quantifizierung des Plasmakallikrein-CI⁻-Inhibitor-Komplexes in Humanplasma wurde ein Sandwich-ELISA mit folgendem Aufbau entwickelt:

- Beschichtung: 5.0 µg/ml anti-Plasmakallikrein-IgG (Kaninchen);
Inkubation über Nacht, 4°C, Puffer A2
- Antigen: Verdünnungsreihe von Plasma bzw. gereinigter
Komplex in Plasma; 2 h
2. Antikörper: 2 µg/ml anti-CI⁻-Inhibitor (monoklonal); 2 h
- Detektion: 0.3 µg/ml biotinyliertes anti-(Maus-IgG)-IgG
(Schaf); 2 h
BAP-Komplex; 30 min
Substratreaktion; 30 min

Die Ausführung erfolgte wie unter C.2.2.3.a beschrieben.

Die Konzentration des Plasmakallikrein-CI⁻-Inhibitor-Komplexes in Plasma wurde durch Vergleich mit einem Standard bestimmt. Als Standard wurde eine definierte Menge des Komplexes (0.25 µg/ml) in Normalplasma (1:100 in Puffer C) verwendet. Um eine Komplexbildung während des ersten Inkubationsschrittes auszuschließen, wurde dem Verdünnungspuffer ein Überschuß an SBTI (100 µg/ml) zur Inhibition von aktiviertem Plasmakallikrein zugesetzt.

C. 2.2.4. Western Blot und Immunoprint

a) Western Blot (Towbin et al., 1979)

Lösungen:

- Transblot-Puffer 25 mM Tris, 0.15 M Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8.3
- PBS/Tween/RSA 0.05% (w/v) Tween 20, 3 % RSA (w/v) in PBS
(s. C.2.1.6.)

Proteingemische wurden durch SDS-Elektrophorese (s. C.2.3.1.) aufgetrennt und anschließend im gerichteten elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte in einer Transblot-Kammer bei 4°C über 1.5 h bei einer Stromstärke von 600 mA. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose 30 min mit PBS/Tween/RSA inkubiert. Die Visualisierung transferierter Antigene erfolgte durch Immunoprint mit spezifischen Antikörpern (Punkt b).

b) Immunoprint (Burnette, 1981)

Lösungen:

- | | | |
|---|----------------|---|
| A | PBS/Tween | 0.05% Tween 20 in PBS (s. C.2.1.6.) |
| B | Substratlösung | 2.8 mM 4-Chlor-1-naphthol, 3mM H ₂ O ₂ , 0.17 M NaCl, 42 mM Tris, pH 7.4, 17 % (v/v) Methanol |

Mit dem Immunoprint wurde die Spezifität monoklonaler und polyklonaler Antikörper getestet.

Nach erfolgtem Elektrotransfer wurden die freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulose durch Inkubation mit Lösung A blockiert. Anschließend erfolgte die Detektion nach dem Prinzip des indirekten ELISA. Der erste Antikörper wurde über Nacht (4°C) inkubiert, der zweite (biotinylierte) Antikörper drei Stunden unter Schütteln (25°C). Danach wurde 30 min mit BAP-Komplex inkubiert (25°C) und schließlich die Substratreaktion durchgeführt (5 - 15 min, 25°C).

Antikörper und BAP-Komplex wurden in Lösung A verdünnt; zwischen den Inkubationsschritten wurde 3 x 5 min mit Lösung A gewaschen.

Alternativ erfolgte die Detektion mit ¹²⁵I-Protein A:

¹²⁵I-Protein A (s. C.2.1.10.) wurde in Lösung A verdünnt und an Stelle des zweiten Antikörpers eingesetzt. Nach dem Waschen mit Lösung A wurde die Nitrocellulose getrocknet und ein Kodak X-Omat AR-Film aufgelegt. Die Exposition erfolgte für 8 bis 72 h bei 4°C.

C. 2.2.5. Bestimmung apparenter Affinitätskonstanten (Frankel & Gerhard, 1979)

Lösungen: siehe Enzymimmunoassay (C.2.2.3.)

Die Affinitätskonstanten (K_a) monoklonaler Antikörper wurden mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt. ELISA-Röhrchen (Polystyrol) wurden mit Antigen (200 µl pro Röhrchen) in Puffer A1 beschichtet (über Nacht, 4°C). Nach dreimaligem Waschen mit Puffer B wurden die Röhrchen mit Puffer C inkubiert (3 h, 37°C). Nach einmaligem Waschen folgte die Inkubation mit dem zu untersuchenden immunselektierten Antikörper, dem eine ¹²⁵I-markierte (s. C.2.1.10.) Probe (ca. 1 %) des gleichen Antikörpers zugesetzt wurde (über Nacht, 25°C, unter Schütteln). Danach wurde die Inkubationslösung abgenommen und die Röhrchen mit

4 x 250 µl Puffer B gespült. Die Messung der in den Röhrchen zurückgebliebenen Radioaktivität ergab die Menge des gebundenen Antikörpers; freier Antikörper wurde in der mit der Waschlösung vereinigten Inkubationslösung bestimmt. Als Kontrollen wurden unbeschichtete Röhrchen mit Puffer C und anschließend mit dem markierten Antikörper inkubiert. Die unspezifische Bindung war in allen Versuchen kleiner als 2 %.

Die graphische Auswertung erfolgte mittels Scatchard Plot (Scatchard, 1949). Hierbei wird der Quotient aus gebundenem Antikörper zu freiem Antikörper gegen die Konzentration des gebundenen Antikörpers aufgetragen. Die resultierende Gerade hat die Steigung $-nK_a$. n ist die Antikörpervalenz (Zahl der gebundenen Antigenmoleküle pro Antikörper) und K_a die Affinitätskonstante. Für die Bestimmung von K_a wurde willkürlich $n = 1$ eingesetzt.

C. 2.2.6. Immunelektrophorese (Grabar & Williams, 1953)

Lösungen:

- Quieip-Puffer 0.3 mM Calciumlactat, 3 mM NaN_3 , 24 mM Tricine, 80 mM Tris, pH 8.6
- Färbelösung 0,5 % (w/v) Serva Blau R250 in Methanol/ H_2O /Essigsäure (9:9:2, v/v/v)
- Entfärber Methanol/ H_2O /Essigsäure (9:9:2, v/v/v)

Die Immunelektrophorese nach Grabar & Williams (1953) wurde in einer Multiphor-Elektrophorese-Kammer durchgeführt. Es wurde mit 1%igen Agarosegelen (in "Quieip-Puffer") auf Polyesterfolien gearbeitet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 6 V/cm für ca. 1 h (Wasserkühlung), die anschließende Immundiffusion in einer feuchten Kammer für ca. 40 h (25°C). Die präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Anfärben mit Serva Blau R250 (Coomassie Brilliant Blue) visualisiert.

C. 2.3. Sonstige Methoden

C. 2.3.1. Diskontinuierliche SDS-Elektrophorese (Laemmli, 1970)

Die SDS-Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur in Polyacrylamid(PAA)-Gradientengelen durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer (4 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) Glycerin, 0.25 M Tris, pH 6.8) gemischt. Für die Reduktion der Proteine wurden dem Probenpuffer 10 % (w/v) DTT

zugesetzt und die Proben 5 min bei 95°C inkubiert. Die Stromstärke während der Elektrophorese betrug 30 mA im Sammelgel (0.5 h) bzw. 40 mA im Trenngel (2.5 h). Die Proteine wurden durch Coomassie Brilliant Blue oder durch Silberfärbung (Oakley et al., 1980) sichtbar gemacht oder nach Transfer auf Nitrocellulose durch Immunoprint (s. C.2.2.4.) detektiert.

C. 2.3.2. Bestimmung der amidolytischen Aktivität von Plasmakallikrein (van der Graaf et al., 1982)

Lösungen:

- Substrat 0.6 mM S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-p-Nitroanilid) in 1 mg/ml RSA, 0.15 M Tris-HCl, pH 8.3

Mit dem Test wurde die Aktivierung von Prokallikrein durch β -Faktor XIIa, der Einfluß von Antikörpern auf die Kallikreinaktivität und die Prokallikreinaktivierung, sowie die Inhibition von Plasmakallikrein durch C $\bar{I}$ -Inhibitor verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von 10400 M $^{-1}$ cm $^{-1}$ für p-Nitroanilin eingesetzt.

Die Messung der amidolytischen Aktivität wurde bei 37°C in Plastikkuvetten durchgeführt:

10 μ l der zu testenden Plasmakallikreinlösung wurden zu 500 μ l Substrat pipettiert. Die Hydrolyse des Substrats wurde im Eppendorf-Photometer bei 405 nm verfolgt.

C. 2.3.3. Limitierte Proteolyse von HMW Kininogen mit Plasmakallikrein (Müller-Esterl et al., 1986)

HMW Kininogen (s. C.2.3.6.a) wurde mit Plasmakallikrein unter Freisetzung von Bradykinin gespalten. Die Reaktion wurde bei 37°C in 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, durchgeführt. Das molare Verhältnis von Kallikrein zu HMW Kininogen betrug 1:70 (Gewichtsverhältnis 1:100). Nach definierten Zeitintervallen wurden Proben (7 μ l, entsprechend 15 μ g HMW Kininogen) entnommen, mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer (mit 10 % DTT) gemischt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Fragmente wurden in einer SDS-Elektrophorese (s. C.2.3.1.) aufgetrennt.

C. 2.3.4. Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (Proctor & Rapaport, 1961)

Mit dem Testsystem wurde die Korrektur der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) von Prokallikrein-Mangelplasma (Fletcher-Plasma) durch Prokallikrein bestimmt und die Interaktion monoklonaler Antikörper mit der Kontaktphasenaktivierung untersucht.

Die Bestimmung der PTT wurde mit einem Coagulometer (nach Schnitger und Gross) durchgeführt. 50 μ l einer Plasmaprobe wurden mit 50 μ l isotonischer Natriumchlorid- bzw. Testlösung versetzt und 2 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l PTT-Reagenz und nach 3 min bei 37°C 100 μ l einer 25 mM CaCl_2 -Lösung zugegeben. Die Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels wurde gemessen.

C. 2.3.5. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde durch Messen der Extinktion einer Proteinlösung bei 280 nm durchgeführt. Dabei wurden folgende spezifische Extinktionswerte ($E_{280\text{nm}}^{1\%}$) eingesetzt:

	$E_{280\text{nm}}^{1\%}$
Komplexe Proteingemische	10.0
Plasmakallikrein	10.9
$\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor	4.5
IgG	13.6

C. 2.3.6. Proteine und Reagenzien aus dem Laborbestand

Folgende Proteine/Reagenzien wurden im Labor hergestellt und standen für die Versuche zur Verfügung:

a) HMW Kininogen

Die Isolierung wurde nach Müller-Esterl et al. (1983) durchgeführt.

b) Leichte Kette von HMW Kininogen

Die leichte Kette von HMW Kininogen wurde nach Müller-Esterl et al. (1986) isoliert.

c) Peroxidase-gekoppelte Antikörper

Die Herstellung erfolgte mit der SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat)-Methode nach Carlsson et al. (1978).

d) BAP-Komplex

BAP-Komplex wurde vor Gebrauch frisch hergestellt: Avidin (1 mg/ml) wurde mit biotinylierter Peroxidase (1 mg/ml) gemischt, im jeweiligen Puffer (für ELISA bzw. Immunoprint) verdünnt (1:500 - 1:1000) und 30 min bei 25°C vorinkubiert.

e) Polyklonale Antikörper

Antisera gegen HMW Kininogen und Human-Albumin (aus Kaninchen) wurden nach konventionellen Methoden gewonnen (s. C.2.2.1.). Die Antikörper wurden durch Immunselektion isoliert.

D. ERGEBNISSE

D. 1. Isolierung von Plasmakallikrein

Ausgangsmaterial für die Isolierung (s. C.2.1.1.) war Cohn-Fraktion IV-1 (lyophilisiert) aus menschlichem Plasma. Die Isolierungsprozedur beruhte auf Affinitätschromatographie an SBTI-Sepharose und HMW Kininogen-Sepharose. Aus 300 g Lyophilisat konnten 10 mg Plasmakallikrein isoliert werden. Das Plasmakallikrein erschien in der SDS-Elektrophorese (s. C.2.3.1.) unter nicht-reduzierenden Bedingungen als Doppelbande (M_r 85 000 bzw. 83 000), bedingt durch die Heterogenität der Kohlenhydratanteile der leichten Kette. Unter reduzierenden Bedingungen erschienen eine Bande bei M_r 43 000 (schwere Kette) und eine Doppelbande bei M_r 38 000 bzw. 35 000 (leichte Kette), sowie zwei Banden bei M_r 28 000 und 22 000, die als Abbauprodukte der schweren Kette bekannt sind (Nagase & Barrett, 1981) und durch Autoproteolyse entstehen (Burger et al., 1985).

D. 2. Isolierung von Plasmaprokallikrein

Plasmaprokallikrein wurde aus Humanplasma durch Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie an HMW Kininogen-Sepharose und Immunaффinitätschromatographie an anti-Plasmakallikrein-Sepharose isoliert (s. C.2.1.2.). Aus 200 ml Plasma konnten durchschnittlich 1.25 mg Prokallikrein isoliert werden. Bei einer Plasmakonzentration von 50 mg/l entspricht dies einer Ausbeute von ca. 12 %. Der Verlauf der Isolierungsprozedur ist in Abb. 6 gezeigt. Das Endprodukt enthielt bei einzelnen Isolierungen unterschiedliche Mengen an aktiviertem Kallikrein (erkennbar am Erscheinen der schweren und leichten Ketten in der SDS-Elektrophorese nach Reduktion). Unter massivem Inhibitorschutz (DFP) lagen 90 - 95 % des Proteins als Prokallikrein vor; ohne Inhibitorzusatz wurde dagegen vollständig aktiviertes Plasmakallikrein erhalten. Die Aktivitätsbestimmung von Plasmakallikrein (s. C.2.3.2.) ergab in Übereinstimmung mit publizierten Werten (van der Graaf et al., 1982) eine spezifische Aktivität von 58 U/mg.

Als "Nebenprodukt" der Isolierung fiel weitgehend gereinigter Faktor XI mit einem apparenten M_r von 200 000 an (1.5 mg aus 2.5 l Plasma).



Abb. 6. SDS-Elektrophorese der Prokallikrein-Isolierung (PAA-Gradient 7.5 - 15; Färbung mit Coomassie Brilliant Blue; nicht-reduzierende Bedingungen)
a: Plasma, 0.6 µl; b: Durchlauf QAE-Sephadex, 30 µg; c: Eluat HMW Kininogen-Sephadex, 30 µg; d: Durchlauf anti-IgG- u. anti-Albumin-Sephadex, 30 µg; e: Eluat anti-Plasmakallikrein-Sephadex, 30 µg

D. 3. Charakterisierung von Plasma(pro)kallikrein

D. 3.1. Aktivierung von Prokallikrein durch β -Faktor XIIa

Prokallikrein wurde mit β -Faktor XIIa durch limitierte Proteolyse aktiviert. 4.2 ng β -Faktor XIIa wurden mit 0.6 µg Prokallikrein (molares Verhältnis 1:50) in 1 mg/ml RSA, 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, inkubiert (37°C). Nach 0, 30, 60, 120 und 240 min wurden Proben von 0.1 µg Kallikrein auf ihre enzymatische Aktivität getestet (s. C.2.3.2.). Die Aktivierungskurve erreichte nach ca. 2 h ein Plateau, während die Aktivitätszunahme ohne β -Faktor XIIa praktisch vernachlässigbar war (Abb. 7).

Für die elektrophoretische Analyse der Prokallikrein-Aktivierung wurden 3.2 µg β -Faktor XIIa mit 90 µg Prokallikrein (molares Verhältnis 1:10) in 1 mg/ml RSA, 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, inkubiert (37°C). Nach 1, 2, 5, 10 und 20 min wurden Proben (15 µg Kallikrein) entnommen, mit dem gleichen Volumen Probenpuffer (+ 10 % DTT) gemischt, 5 min bei 95°C inkubiert und auf ein SDS-Gel (10 - 15 % PAA) aufgetragen. Dabei

zeigte sich die Umwandlung des Einkettenmoleküls in eine schwere (M_r 43 000) und eine leichte Kette (M_r 38 000/35 000) (Abb. 8).

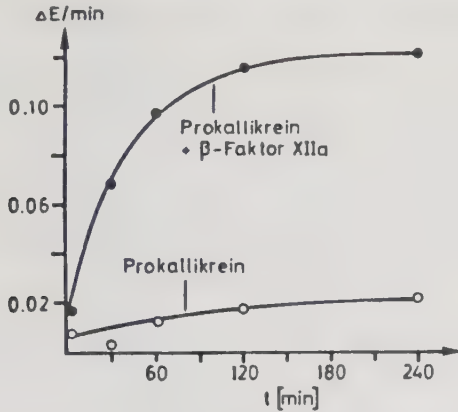


Abb. 7. Verlauf der amidolytischen Aktivität bei der Aktivierung von Prokallikrein durch β -Faktor XIIa
Abszisse: Zeitskala; Ordinate: Enzymaktivität ($\Delta E/min$).

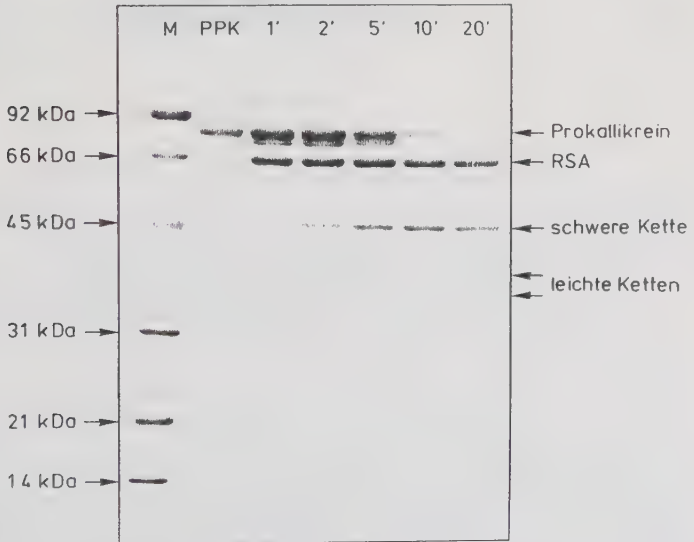


Abb. 8. Zeitlicher Verlauf der Prokallikreinaktivierung durch β -Faktor XIIa in der SDS-Elektrophorese
M: Markerproteine; PPK: Plasmaprokallikrein

D. 3.2. Limitierte Proteolyse von HMW Kininogen

Zur weiteren Charakterisierung des Kallikreinpräparates wurde der Zeitverlauf der limitierten Proteolyse von HMW Kininogen durch aktiviertes Plasmakallikrein untersucht. Dabei wird das Nonapeptid Bradykinin freigesetzt und HMW Kininogen (M_r 114 000) in zwei Hauptfragmente (schwere Kette, M_r 63 000, und leichte Kette, M_r 58 000) gespalten, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Bei längerer Einwirkung des Kallikreins treten noch niedermolekulare Spaltprodukte der leichten Kette mit einem M_r von 40 000 – 45 000 auf (Abb. 9).

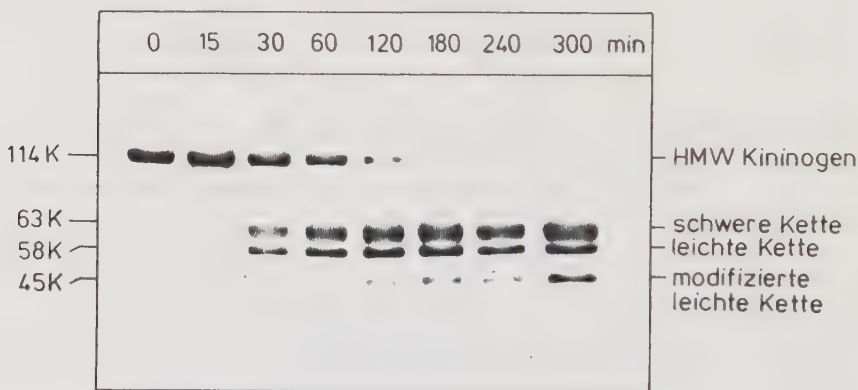


Abb. 9. Zeitlicher Verlauf der limitierten Proteolyse von HMW Kininogen

Spaltung und SDS-Elektrophorese wurden nach C.2.3.3. durchgeführt. Die Proteine (15 μ g/Lauflinie) wurden in einem 10 – 25 % PAA-Gradienten aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

D. 3.3. Prokoagulatorische Aktivität von Prokallikrein

Zur Überprüfung der Gerinnungsaktivität des isolierten Plasmakallikreins wurde die Korrektur der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) eines Defizienzplasmas ("Fletcher-Plasma") durch steigende Mengen an gereinigtem Plasmakallikrein untersucht. Dabei ergab sich, daß die zur Normalisierung erforderliche Menge etwa um den Faktor 4 über den physiologisch gegebenen Konzentrationen liegt, was durch eine partielle Denaturierung des Prokallikreins während der Isolierung bedingt sein dürfte (Abb. 10).

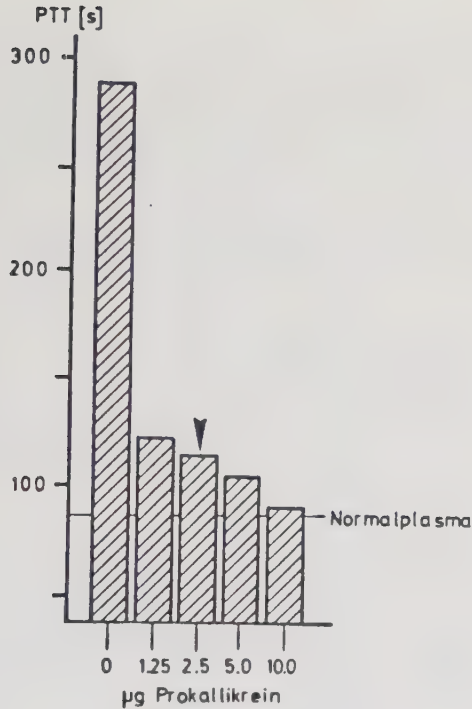


Abb. 10. Korrektur der PTT von Fletcher-Plasma durch Prokallikrein

50 µl Fletcher-Plasma wurden mit steigenden Mengen Prokallikrein (in 50 µl isotonischer Kochsalzlösung) 2 min inkubiert. Die PTT wurde nach C.2.3.4. bestimmt.

▼: physiologische Konzentration von Prokallikrein

D. 4. Isolierung der leichten Kette von Plasmakallikrein

Für die Produktion monoklonaler Antikörper gegen die leichte Kette des Plasmakallikreins war es nötig, Mäuse mit der gereinigten leichten Kette zu immunisieren. Aus 3.8 mg Prokallikrein konnten 0.7 mg leichte Kette wie unter C.2.1.3. beschrieben isoliert werden (s. Abb. 11). Dazu wurde Prokallikrein durch β -Faktor XIIa vollständig aktiviert, unter milden Bedingungen partiell reduziert und carboxymethyliert. Die freie schwere Kette und restliches Plasmakallikrein wurden durch Immunadsorp-

tion an PK 1-Sepharose entfernt (PK 1: monoklonaler Antikörper gegen die schwere Kette, s. D.7.2.1.), und die nicht-adsorbierte leichte Kette direkt aus dem Durchlauf gewonnen. Auf eine quantitative Reduktion des Plasmakallikreins (um die Ausbeute an leichter Kette zu erhöhen) wurde verzichtet, da bei höheren DTT-Konzentrationen die Immunreaktivität des Plasmakallikreins mit monoklonalen Antikörpern verloren ging. Mit Hilfe dieser Prozedur wurde eine weitgehend homogene Präparation der leichten Kette von Plasmakallikrein erhalten (Ausbeute ca. 50 %).

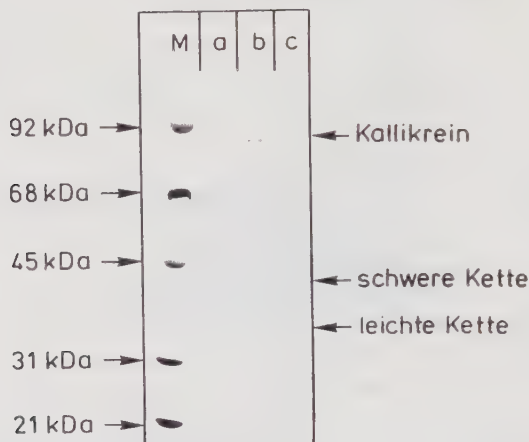


Abb. 11. Verfolgung der Isolierung der leichten Kette von Plasmakallikrein durch SDS-Elektrophorese (7.5 - 15 % PAA, Färbung mit Coomassie Brilliant Blue, nicht-reduzierende Bedingungen)

M: Markerproteine; a: Plasmakallikrein (reduziert und carboxymethyliert), 10 µg; b: Eluat der anti-Plasmakallikrein-Sepharose, 10 µg; c: leichte Kette von Plasmakallikrein, 10 µg

D. 5. Isolierung und Charakterisierung von C1^- -Inhibitor

Mit Hilfe von PEG-Fällung, Ionenaustauschchromatographie und Immunaффinitätschromatographie konnten aus 500 ml Plasma 50 mg C1^- -Inhibitor isoliert werden (s. C.2.1.4.). Bei einer Plasmakonzentration von 200 mg/l entspricht dies einer Ausbeute von 50 %. Der Inhibitor zeigte in der SDS-Elektrophorese (Abb. 12) jeweils eine Hauptbande mit M_r 120 000 (nicht reduziert) bzw. 92 000

(reduziert). Bei einem Teil der Isolierungen traten unter nicht-reduzierenden Bedingungen bis zu vier Banden auf (vgl. Abb. 14), die durch proteolytische Modifikation oder durch Modifikation des Kohlenhydratanteils während der Isolierung bedingt waren. Unter reduzierenden Bedingungen erschien der Inhibitor entweder als Einzelbande oder als Doppelbande bei M_r 92 000/90 000.

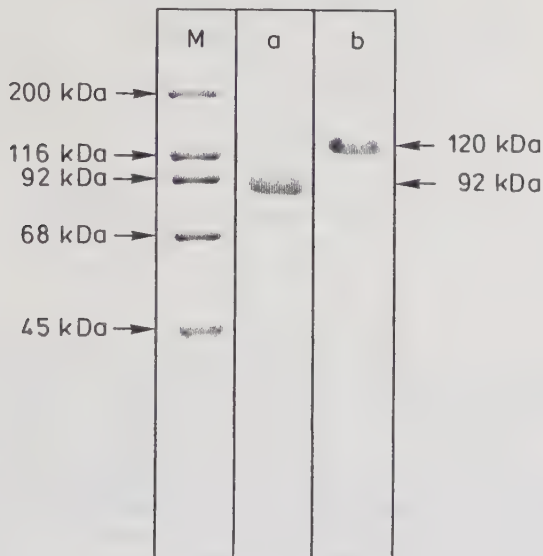


Abb. 12. SDS-Elektrophorese von gereinigtem $C1^{\bar{}}$ -Inhibitor (10 - 15 % PAA; Färbung mit Coomassie Blue)
M: Markerproteine; a: $C1^{\bar{}}$ -Inhibitor, reduziert, 30 μ g;
b: $C1^{\bar{}}$ -Inhibitor, nicht reduziert, 30 μ g.

Die biologische Aktivität des $C1^{\bar{}}$ -Inhibitors wurde in einem Enzymtest geprüft (Abb. 13). Um die amidolytische Aktivität von Plasmakallikrein vollständig zu hemmen, war ein 1.5facher molarer Überschuß (extrapolierter Wert) von $C1^{\bar{}}$ -Inhibitor erforderlich. Dies deutet darauf hin, daß nur ein Teil des isolierten Inhibitors biologisch aktiv war, da der aktive Inhibitor Plasmakallikrein in äquimolaren Mengen inhibiert. Der Aktivitätsverlust des Inhibitors ist vermutlich durch die extremen Elutionsbedingungen (pH 2.2) der Affinitätssäule und/ oder das Vorhandensein von (proteolytisch) modifiziertem Inhibitor bedingt.

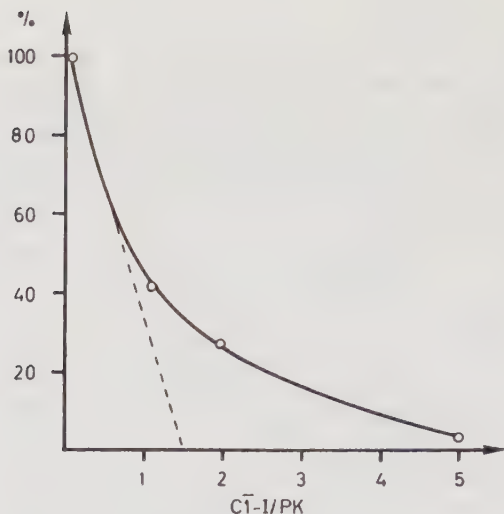


Abb. 13. Inhibition von Plasmakallikrein durch $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor
 0,1 μg Plasmakallikrein wurden mit steigenden Mengen $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor (molares Verhältnis 1:1, 1:2, 1:5) bei 37°C in 1 mg/ml RSA, 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, inkubiert. Nach 20 min wurde die enzymatische Restaktivität des Plasmakallikreins bestimmt (s. C.2.3.2.). Abszisse: molares Verhältnis $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor/Plasmakallikrein; Ordinate: Restaktivität des Plasmakallikreins in %

D. 6. Isolierung des Plasmakallikrein- $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor-Komplexes

Der kovalente Komplex aus Plasmakallikrein und $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor wurde als Antigen für die Produktion monoklonaler Antikörper und für die Entwicklung eines Sandwich-ELISAs zur Quantifizierung des Komplexes eingesetzt. Nach Inkubation von 4,2 mg Plasmakallikrein mit 16,7 mg $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor wurden 2,8 mg (30 % der Theorie) Komplex durch zwei aufeinanderfolgende immunaffinitätschromatographische Schritte gewonnen (s. C.2.1.5.). Zuerst wurden Komplex und freies Plasmakallikrein an anti-Plasmakallikrein-Sepharose adsorbiert (Entfernung von freiem $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor); danach wurde freies Kallikrein durch Adsorption des Komplexes an anti- $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor-Sepharose entfernt. Von der anti- $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor-Sepharose konnte schließlich der gereinigte Komplex (M_r 210 000) eluiert werden. Ausgangsprodukte, Reaktionsgemisch und Endprodukt wurden in einer SDS-Elektrophorese kontrolliert (Abb. 14).

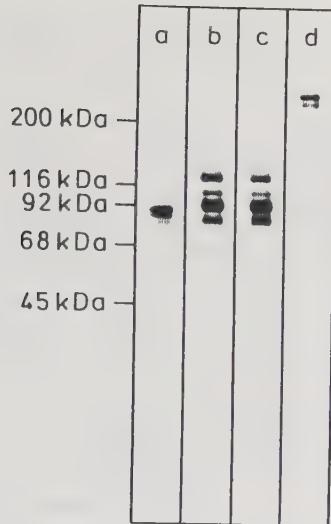


Abb. 14. Analyse der Komplexisolierung mittels SDS-Elektrophorese
(5 - 25 % PAA, Silberfärbung)
a: Plasmakallikrein, 1 μ g; b: C $\bar{1}$ -Inhibitor, 1 μ g;
c: Reaktionsgemisch, 1 μ g; d: gereinigter Komplex, 1 μ g
(nicht-reduzierende Bedingungen)

Die Identität des Komplexes wurde durch Immunoprint (s. C.2.2.4.) mit polyklonalen Antikörpern gegen Plasmakallikrein bzw. C $\bar{1}$ -Inhibitor nachgewiesen (Abb. 15). C $\bar{1}$ -Inhibitor, Plasmakallikrein und das Reaktionsgemisch wurden in einer SDS-Elektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mittels Immunoprint detektiert. Dabei wurden die Einzelkomponenten jeweils von den zugehörigen spezifischen Antikörpern, der Komplex dagegen von beiden Antikörperpopulationen erkannt.

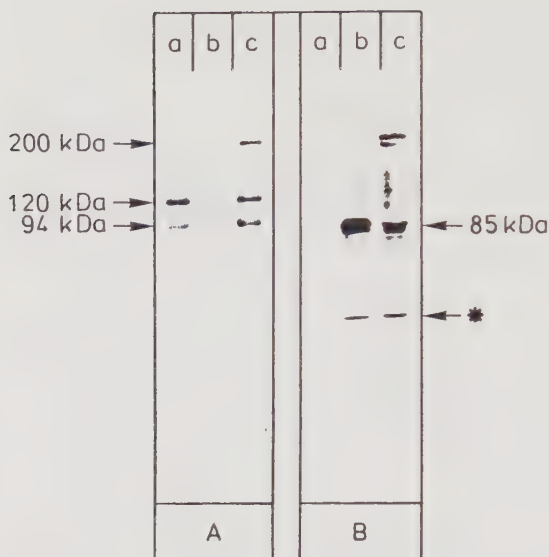


Abb. 15. Immunologische Identifikation des Komplexes mittels Immunoprint

(5 - 25 % PAA)

a: $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor, 1 μg ; b: Plasmakallikrein, 0.25 μg ; c: Reaktionsgemisch, 1.25 μg . Der Immunoprint wurde mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polyklonalem anti- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-IgG (A) bzw. anti-Plasmakallikrein-IgG (B) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit biotinyliertem anti-(Kaninchen-IgG)-IgG, BAP-Komplex und 4-Chlor-1-naphthol.

*: Die meisten Kallikreinpräparationen enthielten Spuren eines Proteins mit M_r 42 000, bei dem es sich um die schwere Kette oder ein Fragment davon handeln dürfte, da es von polyklonalen Antikörpern und von monoklonalen Antikörpern gegen die schwere Kette erkannt wird.

D. 7. Produktion von Antikörpern

D. 7.1. Produktion polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein und C $\bar{1}$ -Inhibitor wurden in Kaninchen produziert. Die Tiere wurden nach dem angegebenen Schema (s. C.2.2.1.) immunisiert. Nach der dritten, vierten und fünften Boosterinjektion wurden Probeblutungen abgenommen und der Titeranstieg an spezifischen Antikörpern mittels indirektem ELISA (s. C.2.2.3.a) verfolgt (Abb. 16). Als (relativer) Titer wurde die größte Verdünnung bezeichnet, bei der noch eine maximale Extinktion im ELISA ($E_{405} = 1.5$) erreicht wurde. Beim Erreichen eines Titers von mindestens 1:5000 wurden die Tiere entblutet und die spezifischen Antikörper durch Immunselektion am immobilisierten Antigen (s. C.2.1.6.a) gereinigt. Die Spezifität der Antikörper wurde durch Western Blot und Immunoprint überprüft (Abb. 17). In Humanplasma wurde eine Doppelbande auf der gleichen Höhe wie gereinigtes Prokallikrein detektiert.

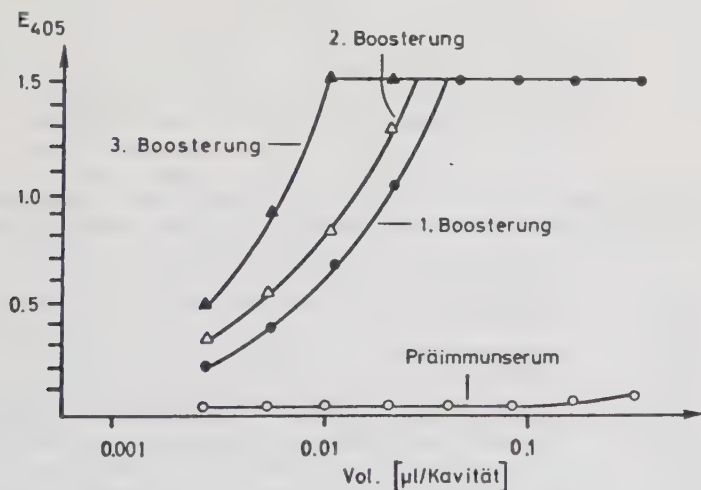


Abb. 16. Titerverlaufskontrolle eines mit Plasmakallikrein immunisierten Kaninchens im indirekten ELISA
Beschriftung: 0.1 μ g/ml Plasmakallikrein; Abszisse: Volumen des Antiserums

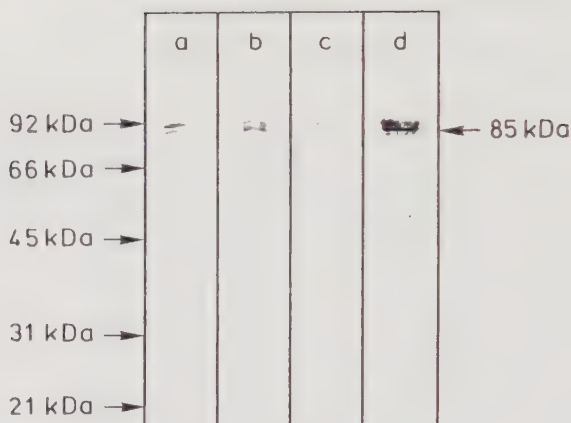


Abb. 17. Spezifität poly- und monoklonaler Antikörper gegen Plasmakallikrein im Immunoprint

5 μ l Humanplasma (= 0.25 μ g Kallikrein) bzw. 2 μ g Prokallikrein pro Lauflinie wurden in der SDS-Elektrophorese (7,5 - 15 % PAA) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Detektion: biotinylierte Antikörper gegen Plasmakallikrein (3 μ g/ml); BAP-Komplex; 4-Chlor-1-naphthol

a: polyklonale Antikörper, b: monoklonaler Antikörper PK 6; c: monoklonaler Antikörper PK 14; d: gereinigtes Prokallikrein, detektiert mit biotinyliertem PK 6

D. 7.2. Produktion monoklonaler Antikörper

D. 7.2.1. Monoklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein

Die Milzzellen einer mit Prokallikrein immunisierten Maus wurden mit Myelomzellen fusioniert, danach in HAT-Selektionsmedium suspendiert und auf drei Zellkulturplatten (je 96 Kavitäten) ausgesät (s. C.2.2.2.). Nach 7 - 10 Tagen war in allen Kavitäten Zellwachstum zu beobachten. Nach 14 Tagen erfolgte der erste Test auf Zellen, die spezifische Antikörper produzierten. Die Zellüberstände (100 μ l/Kavität) wurden auf Plasmakallikreinbeschichtete Mikrotiterplatten übertragen, so daß ein genaues Abbild der Zellkulturplatten auf den ELISA-Platten entstand. Über POD-markiertes anti-(Maus-IgG)-IgG wurden Antikörper gegen Plasmakallikrein indirekt detektiert. In der sog. Dot-Plot-Auswertung (Abb. 18) sind die Kreisdurchmesser den Extinktions-

werten (E_{405}) im ELISA proportional. In ca. 20 % der bewachsenen Kavitäten konnten Antikörper gegen Plasmakallikrein nachgewiesen werden. Die Platten wurden noch ca. 4 Wochen lang in Abständen von 4 Tagen getestet, um langsamer wachsende Antikörper-produzierende Klone zu detektieren.

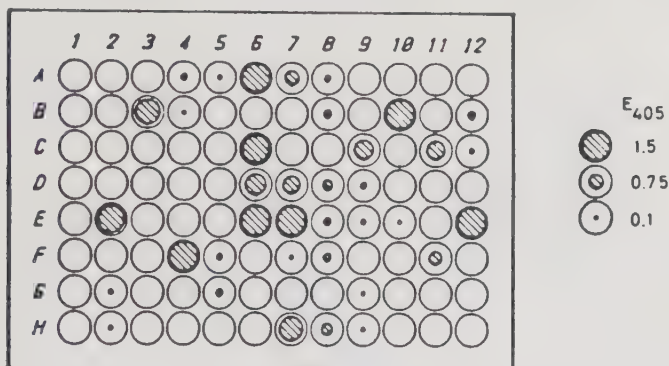


Abb. 18. Test auf Antikörper-produzierende Hybridomazellen im indirekten ELISA
 Beschichtung: 0.1 µg/ml Plasmakallikrein, Proben: 100 µl Zellüberstand

Antikörper-produzierende Zellen wurden auf Kulturplatten mit größeren Kavitäten vermehrt und nach der Methode der limitierenden Verdünnung mindestens dreimal subkloniert. Auf diese Weise wurden 9 verschiedene Klone erhalten, von denen jedoch 2 die Antikörperproduktion zu einem späteren Zeitpunkt einstellten. Von den Klonen PK 1, PK 2, PK 4, PK 6, PK 7, PK 8 und PK 9 konnten Antikörper aus den Kulturüberständen und aus Ascites gewonnen werden. Ihre Spezifität wurde mittels Western Blot und Immunoprint überprüft (s. Abb. 17).

Die Zuordnung der Antikörper zur schweren bzw. leichten Kette des Plasmakallikreins erfolgte mit Hilfe des indirekten ELISAs (s. Abb. 19). Antikörper gegen die schwere Kette binden nur an Plasmakallikrein (PK 1, PK 2), während Antikörper gegen die leichte Kette (PK 11, PK 12) sowohl das Gesamtprotein als auch die isolierte leichte Kette erkennen. Der Immunoprint (Abb. 20) bestätigte die Schlußfolgerungen, wie am Beispiel von PK 1 (gegen die schwere Kette gerichtet) und PK 11 (gegen die leichte Kette gerichtet) gezeigt.

Da alle Klone aus der ersten Fusion (PK 1 – PK 9) mit der schweren Kette reagierten, wurde zur gezielten Gewinnung von

Antikörpern gegen die leichte Kette eine mit Prokallikrein immunisierte Maus mit der gereinigten leichten Kette stimuliert. Aus der nachfolgenden Fusion konnten 7 monoklonale Antikörper (PK 10 - PK 16) gegen die leichte Kette gewonnen werden. Zwei weitere monoklonale Antikörper (PK 17, PK 18) wurden aus einer Fusion erhalten, für die eine Maus ausschließlich mit der leichten Kette immunisiert worden war.

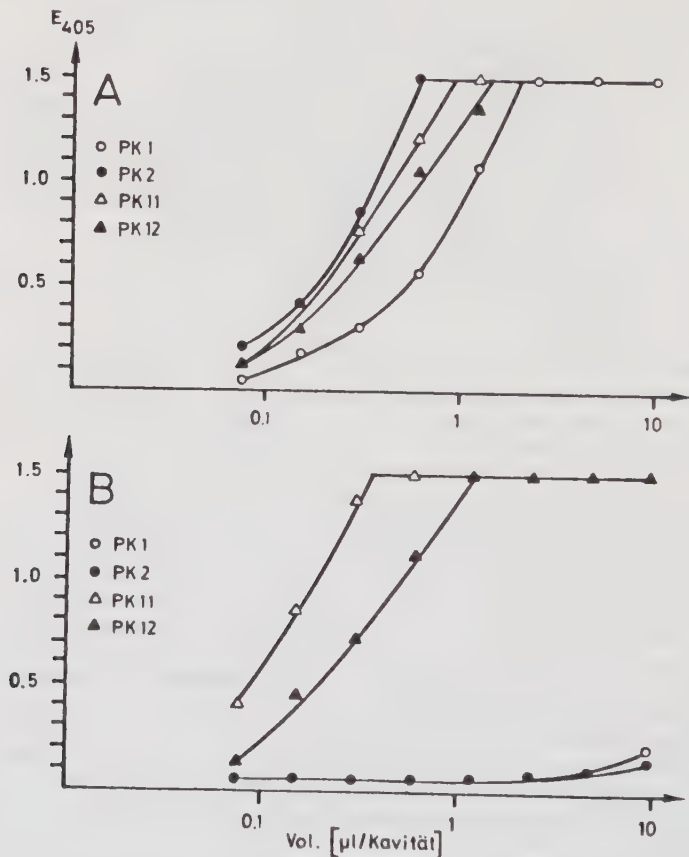


Abb. 19. Zuordnung der monoklonalen Antikörper zur schweren bzw. leichten Kette von Plasmakallikrein (indirekter ELISA) Beschichtung: 0.1 $\mu\text{g/ml}$ Plasmakallikrein (A) bzw. leichte Kette (B); Zellüberstand: PK 1, PK 2 (gegen die schwere Kette); PK 11, PK 12 (gegen die leichte Kette)

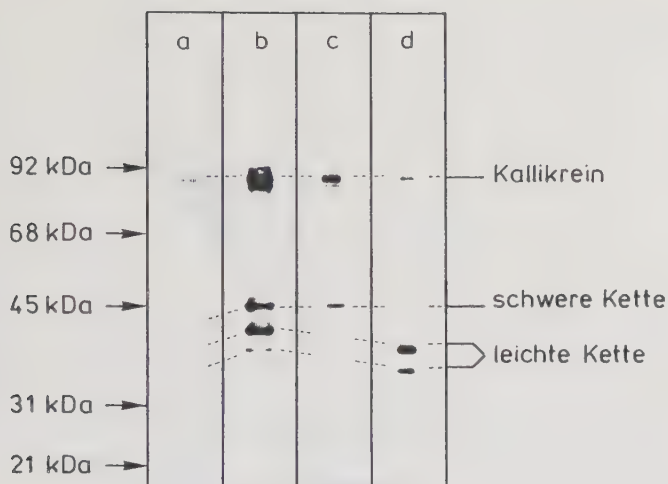


Abb. 20. Immunoprint zur Überprüfung der Spezifität für schwere bzw. leichte Kette

Partiell reduziertes und carboxymethyliertes Plasmakallikrein wurde in einer SDS-Elektrophorese (7.5 - 15 % PAA) aufgetrennt (je 2 µg pro Lauflinie). a: Färbung mit Coomassie Brilliant Blue; b - d: Immunoprint mit verschiedenen Antikörpern (je 3 µg/ml); b: polyklonale Antikörper; c: PK 1; d: PK 11. Die Detektion erfolgte mit biotinyliertem anti-(Maus-IgG)-IgG, BAP-Komplex und 4-Chlor-1-naphthol.

Da die einzelnen Lauflinien aus verschiedenen SDS-Gelen stammen, sind die Laufstrecken der einzelnen Fragmente nicht identisch.

D. 7.2.2. Monoklonale Antikörper gegen CI^- -Inhibitor

Mit der am Beispiel Plasmakallikrein detailliert beschriebenen Methode (D.7.2.1.) wurden auch 8 verschiedene monoklonale Antikörper gegen CI^- -Inhibitor (CI 1 - CI 8) gewonnen. Ihre Spezifität wurde mittels Immunoprint getestet. Dabei wurde im Gesamtplasma jeweils eine einzige Bande auf der gleichen Höhe wie gereinigter CI^- -Inhibitor detektiert (am Beispiel von CI 1 in Abb. 21 gezeigt).

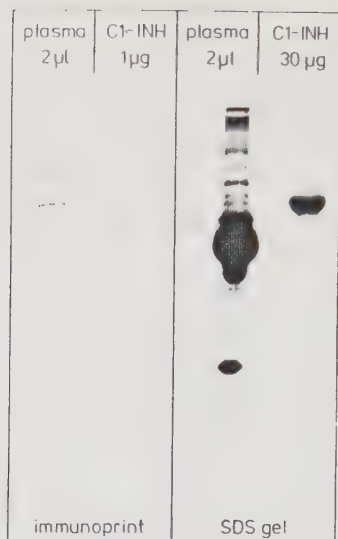


Abb. 21. Immunoprint mit dem monoklonalen Antikörper CI 1 gegen C $\bar{I}$ -Inhibitor

PAA-Gradient 7.5 - 15 %; links: Detektion mit CI 1 (0.1 µg/ml), ^{125}I -Protein A, Autoradiographie; rechts: Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

D. 7.2.3. Monoklonale Antikörper gegen den Plasmakallikrein-C $\bar{I}$ -Inhibitor-Komplex

Der Komplex aus Plasmakallikrein und C $\bar{I}$ -Inhibitor besitzt antigene Determinanten, die nicht auf den beiden nativen Proteinen vorkommen (de Agostini et al., 1985). Um monoklonale Antikörper zu erhalten, die bevorzugt den Komplex, aber nur schwach oder überhaupt nicht die nativen Proteine erkennen, wurden 5 Mäuse mit dem gereinigten Komplex immunisiert. Die aus den darauf folgenden Fusionen erhaltenen Antikörper wurden im indirekten ELISA auf ihre Bindung sowohl an den Komplex als auch an die Einzelkomponenten untersucht. Aus 5 Fusionen wurden 30 Antikörper gewonnen, die jeweils mit dem Plasmakallikrein-C $\bar{I}$ -Inhibitor-Komplex und einem der nativen Moleküle (13 mit Plasmakallikrein, 16 mit C $\bar{I}$ -Inhibitor) reagierten. Nur ein Antikörper (K 1) zeigte eine bevorzugte Bindung an den Komplex gegenüber Plasmakallikrein (Abb. 22, s. D.8.3.); kein Antikörper erkannte ausschließlich den Komplex.

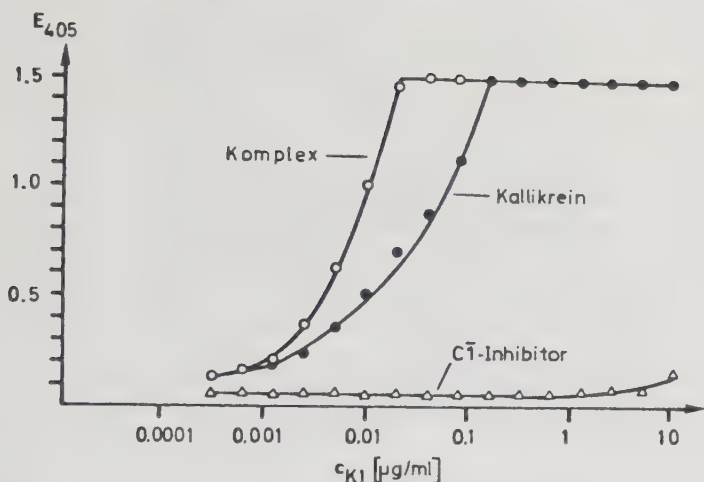


Abb. 22. Spezifität des Antikörpers K 1 im indirekten ELISA
 Beschichtung: 0.2 µg/ml Komplex; 0.1 µg/ml Plasmakallikrein; 0.1 µg/ml C1-Inhibitor;
 Abszisse: Konzentration von K 1

D. 8. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

D. 8.1. Bestimmung der Antikörper-Subtypen

Die Subtypen der monoklonalen Antikörper wurden mittels eines modifizierten indirekten ELISAs bestimmt (Abb. 23). Antigenbeschichtete Platten wurden mit den Testantikörpern inkubiert. Im nächsten Schritt folgte eine Inkubation mit spezifischen Antisera (aus Kaninchen) gegen die einzelnen Subtypen der Maus-Immunglobuline. Die Detektion wurde mit POD-markiertem anti-(Maus-IgG)-IgG durchgeführt.

Die leichten Ketten aller monoklonalen Antikörper waren vom Subtyp κ , der in ca. 95 % aller Maus-Immunglobuline vertreten ist. (Das Antiserum gegen die λ -Kette zeigte eine schwache Kreuzreaktion mit der κ -Kette). Die schweren Ketten gehörten überwiegend den Subtypen G1 (n = 12) und G2a (n = 9) an, nur eine schwere Kette war vom Subtyp G3, drei Antikörper gehörten zur Klasse der IgM-Antikörper. Die Subtypen der schweren Ketten aller produzierten monoklonalen Antikörper sind in Tabelle 1 aufgelistet.

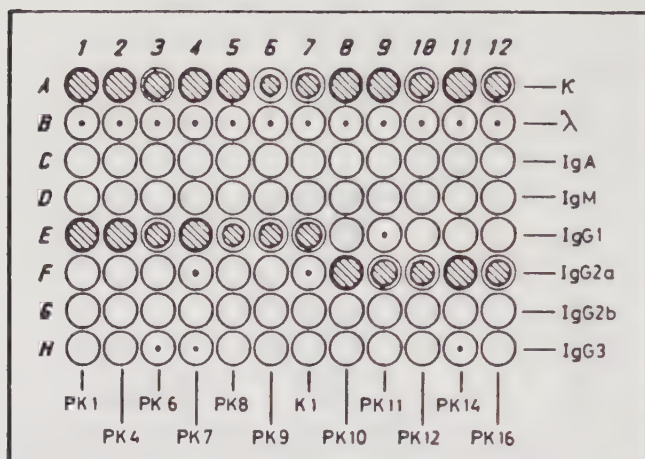


Abb. 23. Subtypisierung monoklonaler Antikörper gegen Plasmakallikrein im indirekten ELISA

Beschichtung: 0.1 µg/ml Plasmakallikrein; 1. Antikörper: Zellüberstand, 1:2 verdünnt; 2. Antikörper: Antisera aus Kaninchen gegen die einzelnen Maus-Immunglobulin-Subtypen (rechts); Detektion: anti-(Kaninchen-IgG)-IgG, POD-konjugiert
Inkubationen: jeweils 2 h bei 37°C

Subtyp	Antikörper
M	CI 5, CI 6, CI 3
G1	PK 1, PK 2, PK 4, PK 6, PK 7, PK 8, PK 9, PK 17, PK 18, K 1 CI 1, CI 8
G2a	PK 10, PK 11, PK 12, PK 13, PK 14, PK 15, PK 16 CI 2, CI 4
G3	CI 7

Tab. 1. Subtypen der schweren Ketten von monoklonalen Antikörpern gegen Plasmakallikrein, C_i-Inhibitor und den Plasmakallikrein-C_i-Inhibitor-Komplex

D. 8.2. Einteilung der Antikörper nach ihrer relativen Epitopspezifität

Die relativen Epitopspezifitäten monoklonaler Antikörper wurden in einem kompetitiven ELISA (s. C.2.2.3.b) ermittelt. Dazu wurden gleiche Volumina einer konstanten Konzentration eines biotinylierten monoklonalen Antikörpers mit einer Verdünnungsreihe (2^n) eines zweiten, nicht biotinylierten Antikörpers (Zellüberstand) gemischt. Diese Mischung wurde auf Antigen-beschichtete Mikrotiterplatten pipettiert und 3 h inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen BAP-Komplex. Erkennt der nicht modifizierte Antikörper dasselbe oder ein räumlich eng benachbartes Epitop wie der biotinylierte Antikörper, so wird letzterer mit steigender Konzentration des um die Bindungsstelle konkurrierenden (nicht-markierten) Antikörpers verdrängt (vgl. Abb. 24). Antikörper gegen verschiedene Epitope beeinflussen sich gegenseitig nicht. Die Ergebnisse der relativen Epitopzuordnung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

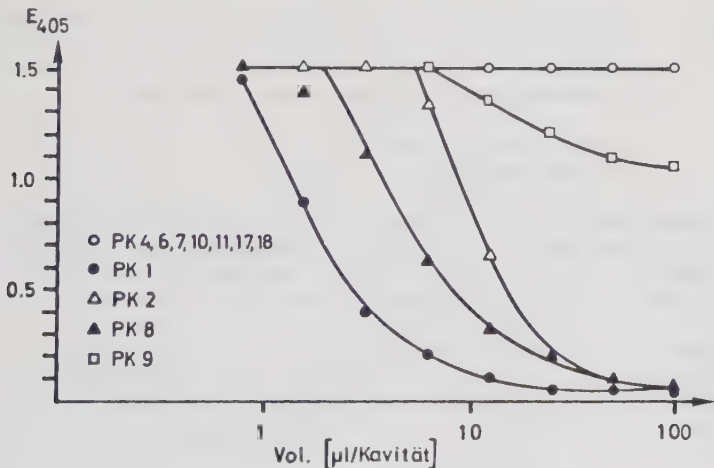


Abb. 24. Beispiel für einen kompetitiven ELISA zur Epitopzuordnung.

Beschichtung: 1.0 $\mu\text{g/ml}$ Plasmakallikrein; biotinylierter Antikörper: PK 1 (0.03 $\mu\text{g/ml}$); Abszisse: Volumen des Zellüberstands von PK 2 – PK 18; PK 1: nicht-markierter Antikörper als Kontrolle.

biotinyllierter Antikörper

	PK 1	PK 2	PK 4	PK 6	PK 7	PK 8	PK 9	PK10	PK11	PK17
konkurrierender Antikörper	PK 1	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	PK 2	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	PK 4	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	PK 6	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	PK 7	-	-	+	-	+	-	-	0	0
	PK 8	+	+	-	-	-	+	-	0	0
	PK 9	(+)	(+)	-	-	-	(+)	+	0	0
	PK10	-	-	-	-	-	0	0	+	+
	PK11	-	-	-	-	-	0	0	+	+
	PK12	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	PK13	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	PK14	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	PK15	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	PK16	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	PK17	-	-	-	-	0	0	0	-	-
	PK18	-	-	-	-	0	0	0	-	-
	K 1	+	+	-	-	0	0	0	-	-

Tab. 2. Relative Epitopkartierung monoklonaler Antikörper gegen Plasmakallikrein bzw. den Plasmakallikrein-CI-Inhibitor-Komplex

- + Verdrängung des biotinylierten Antikörpers
- (+) schwache Verdrängung
- keine Verdrängung
- 0 nicht getestet

Insgesamt wurden Antikörper gegen mindestens fünf verschiedene Epitope des Plasmakallikreins gewonnen. Antikörper einer Gruppe konkurrieren um ein Epitop, während Antikörper aus verschiedenen Gruppen sich wechselseitig nicht verdrängen.

Gruppe A: PK 1, PK 2, PK 8, PK 9, K 1

Gruppe B: PK 4, PK 7

Gruppe C: PK 6

Gruppe D: PK 10, PK 11, PK 12, PK 13, PK 14, PK 15, PK 16

Gruppe E: PK 17, PK 18

Die Antikörper der Gruppen A bis C sind gegen die schwere Kette von Plasmakallikrein gerichtet, Antikörper der Gruppen D und E gegen die leichte Kette. PK 9 kann PK 1 (und die anderen Antikörper der Gruppe A) auch bei großem Überschuß nur unvoll-

ständig verdrängen, was auf einer niedrigen Affinität von PK 9 beruhen dürfte. Der Antikörper K 1, der bevorzugt an den Plasmakallikrein-CI-Inhibitor-Komplex (gegenüber Kallikrein) bindet, kann der Gruppe A zugeordnet werden. Da die übrigen Antikörper der Gruppe eine größere Affinität für natives Plasmakallikrein als für Plasmakallikrein im Komplex mit CI-Inhibitor besitzen, wird möglicherweise das zugehörige Epitop bei der Reaktion von Plasmakallikrein mit CI-Inhibitor in seiner Konformation verändert.

PK 4 und PK 7 werden zwar von PK 6 verdrängt, können aber ihrerseits PK 6 auch bei großem Überschuß nicht verdrängen. Möglicherweise besitzen PK 4 und PK 7 eine zu geringe Affinität, um PK 6 von seinem (eng benachbarten) Epitop verdrängen zu können.

D. 8.3. Bestimmung apparenter Affinitätskonstanten

Für die Bestimmung der Assoziationskonstanten (K_a) monoklonaler Antikörper wurde ein Radioimmunoassay entwickelt (s. C.2.2.5.), der gegenüber der Methode von Frankel & Gerhard (1979) (Bestimmung der gebundenen Antikörper über einen radioaktiv markierten zweiten Antikörper) den Vorteil aufweist, daß die Menge sowohl der gebundenen als auch der freien Antikörper direkt bestimmt werden kann.

In Vorversuchen wurde zunächst die Bindung eines Antikörpers an Antigen-beschichtete Polystyrol-Röhrchen untersucht. Dabei wurden verschiedene Antigenkonzentrationen getestet. Wie in Abb. 25 gezeigt ist, nimmt die Bindung der Antikörper proportional zur applizierten Antikörpermenge zu; darüber hinaus wird die Steigung der resultierenden Geraden von der applizierten Antigen-Konzentration bestimmt. Eine Sättigung war im Bereich von ca. 5 - 10 µg/ml zu beobachten. Für die Bestimmung von K_a wurden die Röhrchen mit einer Antigenlösung von 10 µg/ml Plasmakallikrein oder 20 µg Plasmakallikrein-CI-Inhibitor-Komplex (entsprechend 10 µg Kallikrein) beschichtet, um eine maximale Bindung des Antikörpers zu ermöglichen.

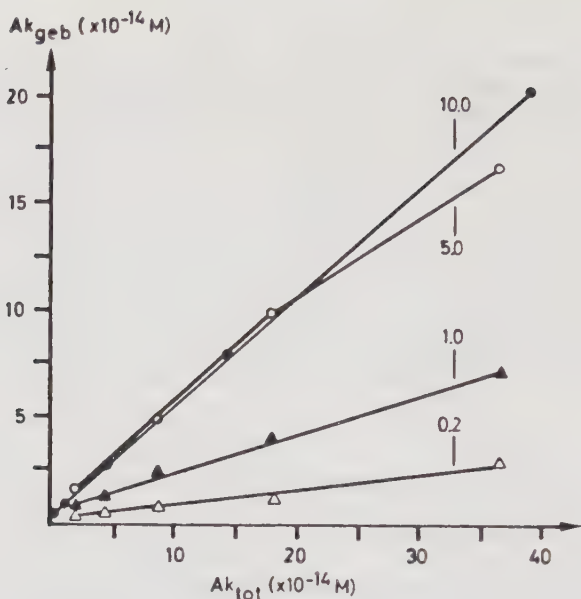


Abb. 25. Optimierung der Antigenbeschichtung

Beschichtung: Plasmakallikrein (0.2, 1, 5, 10 $\mu g/ml$),
 Antikörper: PK 6; Ordinate: gebundener Antikörper;
 Abszisse: eingesetzte Antikörpermenge

Die Affinitätskonstanten (Tab. 3) wurden mittels Dreifachbestimmungen nach der Methode von Scatchard (1949) ermittelt (Abb. 26). Für PK 2, PK 6 und PK 14 liegt K_a zwischen 1×10^8 und 7×10^8 l/mol. Mit PK 4 ergab sich im Scatchard Plot eine Gerade mit positiver Steigung und damit eine negative K_a (vgl. C.2.2.5.); die Affinität dieses Antikörpers kann mit der verwendeten Methode nicht bestimmt werden. Der Antikörper K 1 zeigte erwartungsgemäß (vgl. D.7.2.3.) eine bevorzugte Bindung an den Plasmakallikrein-CI-Inhibitor-Komplex ($K_a = 1.7 \times 10^8$ l/mol) gegenüber Plasmakallikrein ($K_a = 5.4 \times 10^7$ l/mol). Insgesamt liegen die Affinitätskonstanten der monoklonalen Antikörper in der erwarteten Größenordnung.

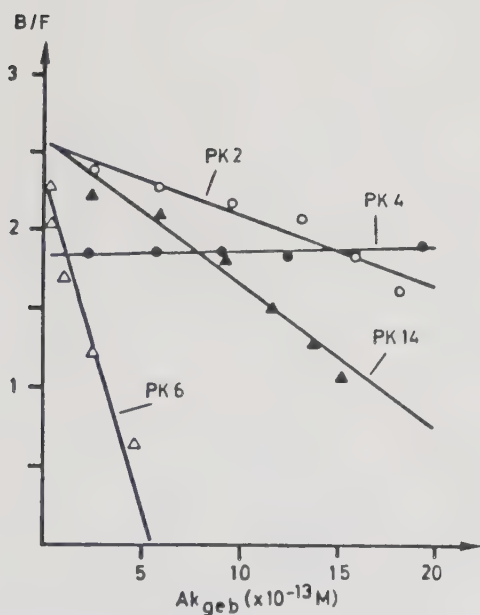


Abb. 26. Scatchard Plot zur Bestimmung der Affinitätskonstanten von PK 2, PK 4, PK 6 und PK 14
 Ordinate (B/F): Verhältnis gebundener Antikörper/freier Antikörper; Abszisse ($A_{k_{geb}}$): Menge des gebundenen Antikörpers

Antikörper	K_a (l/mol)	s_x	Antigen
PK 2	1.0×10^8	8.4 %	Kallikrein
PK 4	—	—	"
PK 6	6.8×10^8	6.5 %	"
PK 14	2.0×10^8	7.6 %	"
K 1	5.4×10^7	10.0 %	"
K 1	1.7×10^8	2.1 %	Komplex

Tab. 3. Affinitätskonstanten (K_a) mit Standardabweichung (s_x) ausgewählter Antikörper gegen Plasmakallikrein und den Plasmakallikrein-CI-Inhibitor-Komplex

D. 9. Interaktion monoklonaler Antikörper mit physiologischen und enzymatischen Funktionen von Plasmakallikrein

Für die Untersuchung der Interaktion von Antikörpern mit den enzymatischen und physiologischen Funktionen des Plasmakallikreins wurden vier repräsentative monoklonale Antikörper (PK 2, PK 4, PK 6, PK 14), die gegen vier verschiedene Epitope von Plasmakallikrein gerichtet sind, sowie polyklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein aus Kaninchen eingesetzt. Als negative Kontrolle wurde jeweils unspezifisches, polyklonales Maus-IgG verwendet.

Die Antikörper PK 17 und PK 18, die gegen ein fünftes Epitop (auf der leichten Kette) gerichtet sind, wurden erst kurz vor Fertigstellung der vorliegenden Arbeit erhalten und konnten daher nicht mehr in allen folgenden Tests eingesetzt werden.

D. 9.1. Einfluß von Antikörpern auf die amidolytische Aktivität von Plasmakallikrein

Die Bestimmung der amidolytischen Aktivität wurde mit dem Substrat S-2302 durchgeführt (s. C.2.3.2.). 500 µl Substratlösung wurden in einer Plastikkuvette vorgelegt. Separat wurden 0.4 µg Plasmakallikrein mit 8 µg Antikörper (10facher molarer Überschuß) bei 37°C vorinkubiert. Nach 30, 60 und 120 min wurden Proben von 0.1 µg (10 µl) Kallikrein entnommen und die amidolytische Aktivität bestimmt (Abb. 27). Monoklonale Antikörper gegen die leichte Kette hatten unterschiedliche Wirkungen auf die Kallikreinaktivität: PK 14 und PK 16 stimulierten überraschenderweise die Substratumsetzung. Die Ursachen für den stimulierenden Effekt sind nicht bekannt; möglicherweise wird die Kallikreinaktivität durch einen allosterischen Effekt erhöht. PK 17 und PK 18 dagegen waren in der Lage, in der eingesetzten Konzentration die Kallikreinaktivität um ca. 30 % zu vermindern, was auf eine Bindung in der Nähe des aktiven Zentrums hinweist. Monoklonale Antikörper gegen die schwere Kette des Enzyms hatten keinen Einfluß auf die Aktivität, während polyklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein die Substratspaltung völlig verhinderten.

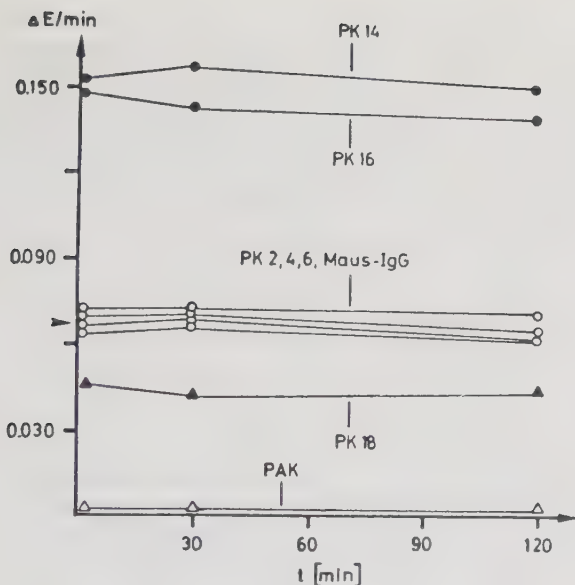


Abb. 27. Amidolytische Aktivität von Plasmakallikrein in Gegenwart von Antikörpern

Abszisse: Zeitskala; Ordinate: Enzymaktivität

PAK: polyklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein;

Maus-IgG: unspezifisches, polyklonales IgG aus Maus

▲: Kontrollwert ohne Antikörperzusatz

D. 9.2. Einfluß der Antikörper auf die Aktivierung von Prokallikrein durch β -Faktor XIIa

Um festzustellen, ob das Zielepitop eines monoklonalen Antikörpers die Spaltstelle für Faktor XII zwischen der schweren und der leichten Kette von Plasmakallikrein umfaßt, wurde die Aktivierung von Prokallikrein mit β -Faktor XIIa in Gegenwart von Antikörpern durchgeführt.

0.5 μ g Prokallikrein, das bereits zu ca. 20 % aktiviert war, wurden mit 10 μ g Antikörper (10facher molarer Überschuß) 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde β -Faktor XIIa im molaren Verhältnis 1:100 zugesetzt. Nach 0, 20, 50 und 80 min Inkubation bei 37°C wurden Proben von 0.1 μ g (10 μ l) Kallikrein auf ihre amidolytische Aktivität getestet (Abb. 28). Polyklonale Antikörper inhibierten die Kallikrein-Aktivität völlig, so daß über ihren Einfluß auf die Aktivierung keine Aussage getroffen werden kann. Monoklonale Antikörper übten keinen Effekt auf die Akti-

vierung aus. Wie in D.9.1. beschrieben, stimuliert PK 14 auch hier die Enzymaktivität, ein Effekt, der mit zunehmendem Anteil an aktivem Plasmakallikrein deutlicher wird. Ebenso bewirkt PK 18 wie in D.9.1. eine partielle Hemmung des Plasmakallikreins. Ein Einfluß auf die Aktivierung durch β -Faktor XIIa konnte jedoch bei beiden Antikörpern nicht festgestellt werden. Folglich ist keiner der getesteten monoklonalen Antikörper gegen die Faktor XII-Spaltstelle des Plasmakallikreins gerichtet.

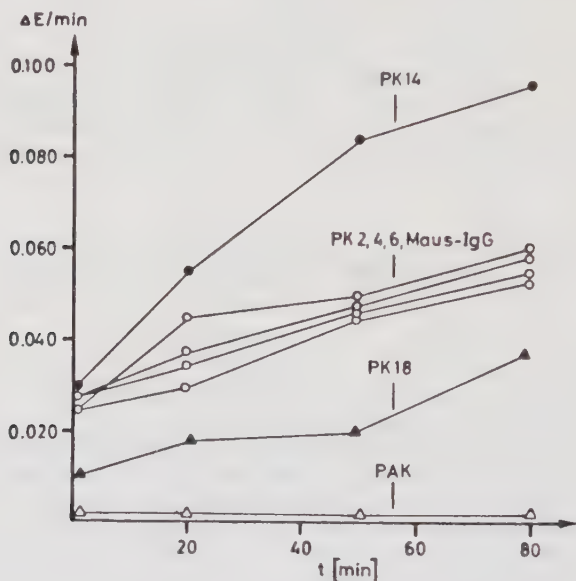


Abb. 28. Aktivierung von Prokallikrein durch β -Faktor XIIa in Gegenwart von Antikörpern
 Abszisse: Zeitskala; Ordinate: Enzymaktivität
 PAK: polyklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein;
 Maus-IgG: unspezifisches, polyklonales IgG aus Maus

D. 9.3. Einfluß der Antikörper auf die Proteolyse von HMW Kininogen durch Plasmakallikrein

Die Aktivität von Plasmakallikrein gegenüber niedermolekularen synthetischen Substraten wird durch die monoklonalen Antikörper PK 2, PK 4, PK 6, PK 14 nicht inhibiert (s. D.9.1.). Es stellte sich die Frage, ob diese Antikörper einen Einfluß auf

die Umsetzung von HMW Kininogen, einem hochmolekularen natürlichen Substrat von Plasmakallikrein, haben. Der Einfluß der Antikörper auf die Proteolyse von HMW Kininogen durch Plasmakallikrein wurde mit Hilfe von SDS-Elektrophorese und Immunoprint studiert.

Plasmakallikrein wurde mit einem 10fachen molaren Überschuß des jeweiligen Antikörpers 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde HMW Kininogen zugesetzt und die limitierte Proteolyse nach C.2.2.3. durchgeführt. Nach 0, 40 und 160 min wurden Proben von 3 µg HMW Kininogen pro Lauflinie entnommen, mit einem gleichen Volumen Laemmli-Probenpuffer (+ DTT) 5 min bei 95°C inkubiert und in einem SDS-Gel (7.5 - 15 % PAA) aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose mittels Western Blot wurde ein Immunoprint mit einem biotinylierten monoklonalen Antikörper gegen die schwere Kette von HMW Kininogen durchgeführt (Abb. 29).

Hat ein Antikörper keinen Einfluß auf die Proteolyse des Kininogens, so sollte nach 40 bzw. 160 Minuten praktisch das gesamte Kininogen gespalten sein und die schwere Kette (M_r 63 000) allein detektiert werden. Wird dagegen die Spaltung verhindert, so sollte nach 160 min noch ungespaltenes HMW Kininogen (M_r 114 000) vorhanden sein.

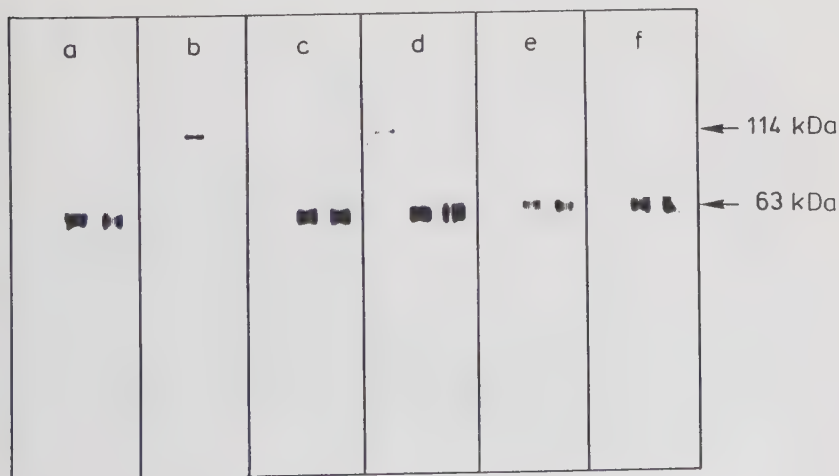


Abb. 29. Limitierte Proteolyse von HMW Kininogen durch Plasmakallikrein in Gegenwart von Antikörpern (Immunoprint)
a: unspezifisches Maus-IgG; b: polyklonales anti-Plasmakallikrein-IgG; c: PK 2; d: PK 4; e: PK 6; f: PK 14

Alle getesteten monoklonalen Antikörper hatten keinen Einfluß auf die Spaltung des Kininogens (erscheinen der schweren Kette nach 40 min), während polyklonale Antikörper die Proteolyse praktisch vollständig verhinderten. Aus den Versuchen D.9.1. und D.9.3. folgt, daß keiner der untersuchten monoklonalen Antikörper einen blockierenden Einfluß auf die Aktivität von Plasmakallikrein gegenüber hoch- und niedermolekularen (natürlichen bzw. synthetischen) Substraten besitzt.

D. 9.4. Einfluß der Antikörper auf die prokoagulatorische Wirkung von Prokallikrein

Die Kontaktphasenaktivierung beruht auf einer Assemblierung der beteiligten Faktoren (Faktor XII, Prokallikrein, HMW Kininogen und Faktor XI) an einer negativ geladenen Oberfläche (s. B.4.1.). Prokallikrein wird hierbei in Form eines Komplexes mit HMW Kininogen gebunden. Ein Antikörper, der diese Komplexbildung oder die proteolytische Faktor XII-Aktivierung durch Plasmakallikrein verhindert, sollte auch die Kontaktphasenaktivierung inhibieren. Um derartige Effekte zu untersuchen, wurde die Korrektur der PTT von Prokallikrein-Defizienzplasma (Fletcher-Plasma) durch isoliertes Prokallikrein in Gegenwart von monoklonalen Antikörpern gemessen (Abb. 30).

1.25 µg Prokallikrein wurden mit 50 µg Antikörper (20facher molarer Überschuß) 1 h bei 37°C vorinkubiert, danach mit 50 µl Fletcher-Plasma gemischt und erneut inkubiert (2 min, 37°C). Die Bestimmung der PTT nach C.2.3.4. ergab, daß PK 6 die Korrektur durch Prokallikrein deutlich abschwächen konnte, während alle anderen monoklonalen Antikörper keinen signifikanten Einfluß ausübten. Mit polyklonalen Antikörpern konnte die PTT-Korrektur weitgehend unterdrückt werden. Eine Wiederholung des Versuchs mit steigenden Antikörpermengen zeigte, daß die Wirkung von PK 6 mit zunehmender Konzentration deutlicher wurde, während die Konzentration von PK 2 und PK 14 ohne Einfluß auf die partielle Thromboplastinzeit blieb (Abb. 31). Da die proteolytische Aktivität des Kallikreins von PK 6 nicht beeinflusst wird (vgl. D.9.1. und D.9.3.), wurde im folgenden untersucht, ob die Verzögerung der Kontaktphasenaktivierung durch PK 6 auf einer Interferenz des Antikörpers mit der Plasmakallikrein-HMW Kininogen-Komplexbildung beruht (s. D.9.5.).

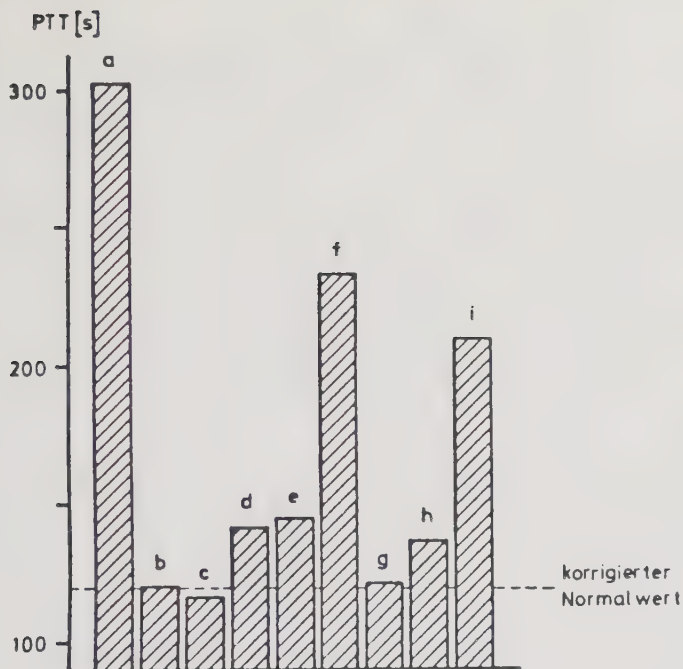


Abb. 30. Korrektur der PTT von Fletcher-Plasma durch isoliertes Prokallikrein in Gegenwart von Antikörpern

- a) MP
 - b) MP + ProPK
 - c) MP + ProPK + Maus-IgG
 - d) MP + ProPK + PK 2
 - e) MP + ProPK + PK 4
 - f) MP + ProPK + PK 6
 - g) MP + ProPK + PK 14
 - h) MP + ProPK + PK 18
 - i) MP + ProPK + PAK (5facher molarer Überschuß)
- (MP = Mangelplasma, ProPK = Plasmaprokallikrein, Maus-IgG = polyklonales, unspezifisches IgG aus Maus, PAK = polyklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein aus Kaninchen)

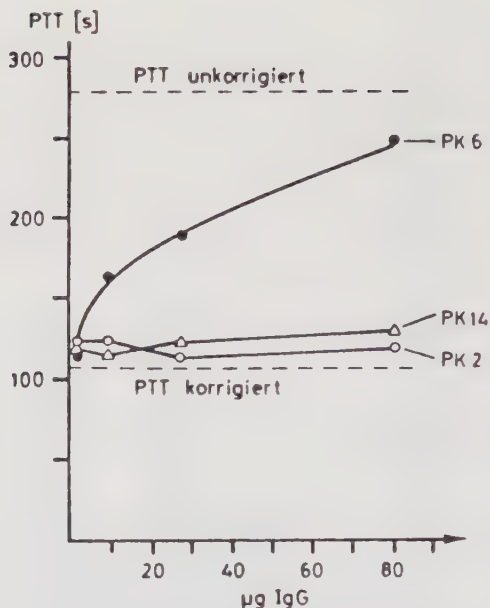


Abb. 31. Einfluß der Antikörperkonzentration auf die PTT-Korrektur

D. 9.5. Einfluß der Antikörper auf die Komplexbildung von HMW Kininogen und Plasmakallikrein

Um die monoklonalen Antikörper auf ihre Interaktion mit der Komplexbildung von HMW Kininogen und Plasmakallikrein zu untersuchen, wurde ein modifizierter kompetitiver ELISA entwickelt (Abb. 32). Gleiche Volumina von biotinyliertem HMW Kininogen (0.5 µg/ml) und einer Verdünnungsreihe (2^n) von Ascites wurden gemischt. Die Mischung wurde auf einer mit Prokallikrein beschichteten ELISA-Platte 3 h inkubiert. Mit BAP-Komplex und nachfolgender Substratreaktion wurde dann das mit Prokallikrein komplexierte Kininogen detektiert. In einem Vorversuch wurde festgestellt, daß bei einer HMW Kininogen-Konzentration von 0.5 µg/ml in Abwesenheit von Antikörpern noch eine maximale Substratreaktion ($E_{405} > 1.5$) ablief. Bereits in Gegenwart niedriger Konzentrationen von PK 6 (ca. 1 µg/ml, entsprechend einer Ascitesverdünnung von 1:1600) wurde die Komplexbildung völlig unterdrückt, während die übrigen monoklonalen Antikörper keinerlei Effekt zeigten. Polyklonale Antikörper in höherer Konzentration (ca. 5 µg/ml) konnten die Komplexbildung ebenfalls verhindern (Abb. 33).

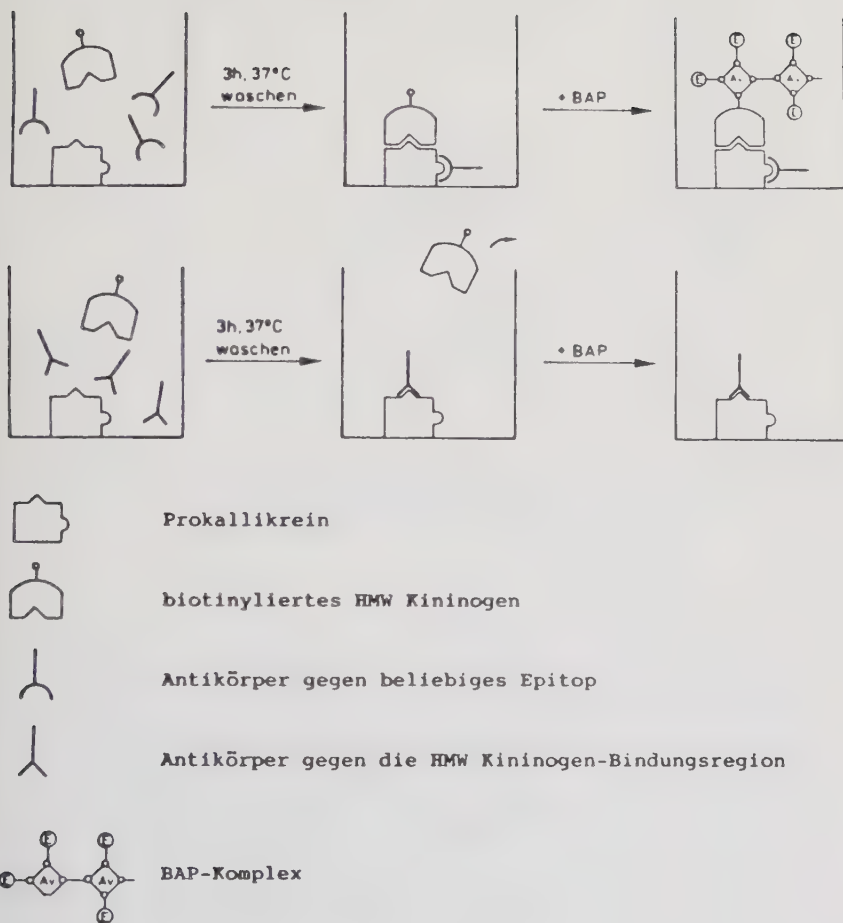


Abb. 32. Prinzip des kompetitiven "ELISAs" zur Detektion von Prokallikrein-HMW Kininogen-Komplexen

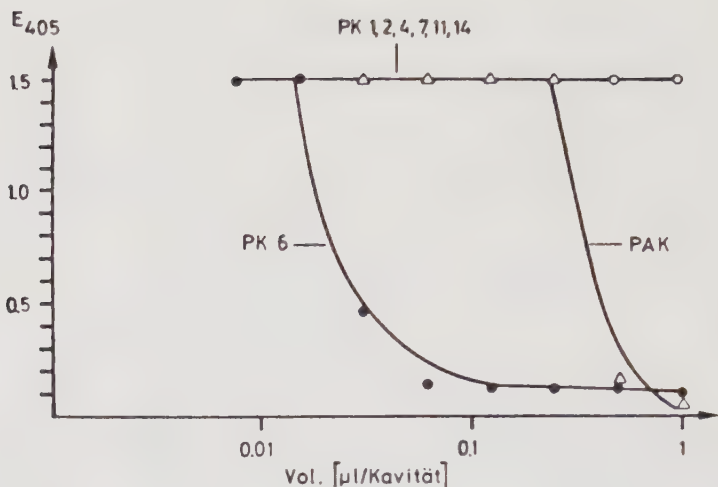


Abb. 33. Einfluß von Antikörpern auf die Komplexbildung von Plasmakallikrein und HMW Kininogen
 Abszisse: Ascitesvolumen (Ausgangskonzentration PAK 10 µg/ml)
 PAK: polyklonale Antikörper

Dieses Ergebnis konnte durch ein Testsystem mit umgekehrtem Aufbau bestätigt werden. Hierbei wurde festgestellt, daß biotinyliertes Plasmakallikrein nicht an HMW Kininogen bindet (vgl. D.10.), weshalb ein indirektes Detektionssystem gewählt wurde (Abb. 34): eine Mischung aus 100 µl Prokallikrein (2 µg/ml) und 100 µl Antikörper (2^n -Verdünnungsreihe, Ausgangskonzentration 2.5 µg/ml) wurde auf HMW Kininogen-beschichteten ELISA-Platten (2 µg/ml) 2 h inkubiert. Gebundene Kallikrein-Antikörper-Komplexe wurden über POD-markiertes anti-(Maus-IgG)-IgG detektiert.

Nur PK 1 erlaubte eine Bindung von Prokallikrein an HMW Kininogen (bei sehr hoher Antikörperverdünnung kann nicht mehr ausreichend anti-(Maus-IgG)-IgG gebunden werden, um eine maximale Substratreaktion zu erzeugen, so daß die Kurve abfällt). Plasmakallikrein-PK-6-Komplexe konnten dagegen nicht detektiert werden, da PK 6 offensichtlich die Bindung von Kallikrein an HMW Kininogen verhindert. Die Kontrolle mit unspezifischem Maus-IgG war ebenfalls negativ (Abb. 35).

Mit der isolierten leichten Kette von HMW Kininogen (s. C.2.3.6.b), auf der die Plasmakallikrein-Bindungsstelle lokalisiert ist, wurde prinzipiell das gleiche Ergebnis erhalten.

Somit konnte durch zwei unabhängige Tests nachgewiesen werden, daß PK 6 ein Epitop erkennt, das auf oder in der Nähe der HMW Kininogen-kininogen-bindenden Region von Plasmakallikrein liegt.

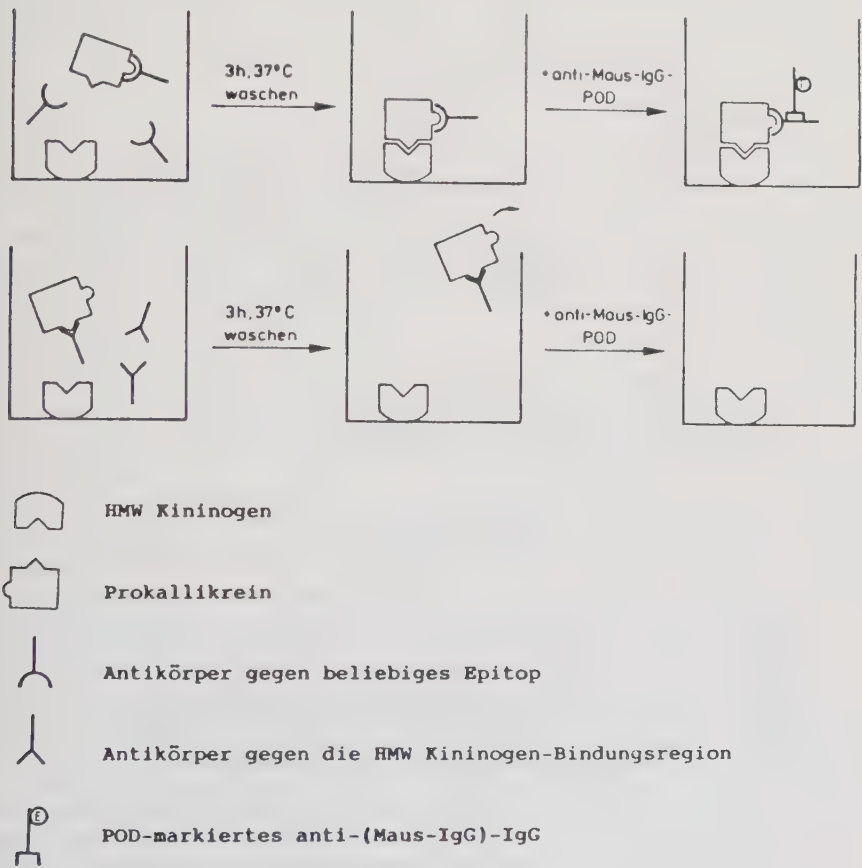


Abb. 34. Testprinzip zur Detektion HMW Kininogen-gebundener Kallikrein-Antikörper-Komplexe

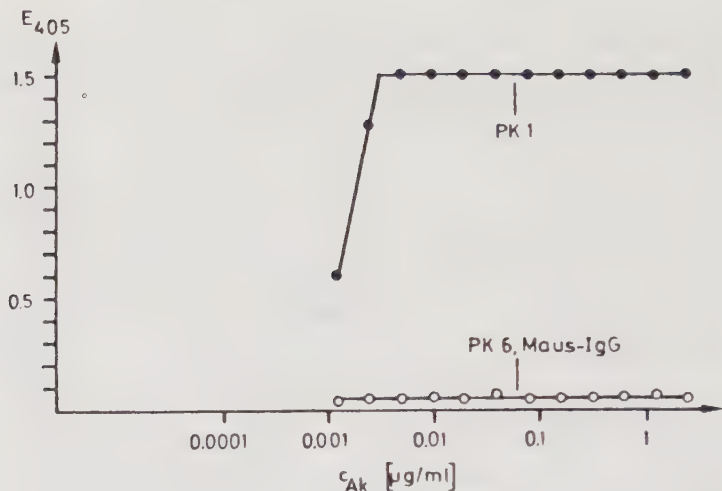


Abb. 35. Bindung von Plasmakallikrein-Antikörper-Komplexen an HMW Kininogen
 Abszisse: Antikörper-Konzentration
 Maus-IgG: unspezifisches, polyklonales IgG aus Maus

Der Beweis, daß PK 6 auch in der Lage ist, einen bereits gebildeten Plasmakallikrein-HMW Kininogen-Komplex zu trennen, wurde mit Hilfe einer immunoelektrophoretischen Technik (s. C.2.2.6.) erbracht. Unter den Bedingungen der Immunelektrophorese (pH 8.6) wandert Plasmakallikrein im elektrischen Feld nicht. Der Plasmakallikrein-HMW Kininogen-Komplex dagegen wandert zur Anode (Scott & Colman, 1980). Mit einer Mischung aus Antikörpern gegen Kallikrein und HMW Kininogen präzipitiert der Komplex als Einzelbande. Die Dissoziation des Komplexes hat zur Folge, daß zwei Präzipitationslinien mit Plasmakallikrein (nicht gewandert) bzw. HMW Kininogen (anodal gewandert) auftreten.

Plasmakallikrein wurde mit einer äquimolaren Menge HMW Kininogen inkubiert (60 min, 37°C). Der resultierende Komplex wurde danach mit einem 2.5fachen Überschuß an PK 6 inkubiert (1 h, 37°C). Nach Durchführung der Elektrophorese folgte eine Immundiffusion gegen anti-Plasmakallikrein- bzw. anti-Kininogen-IgG (s. C. 2.3.6.e). Während der reine Komplex aus Plasmakallikrein und HMW Kininogen als Einzelbande erschien, wurden in Gegenwart von PK 6 zwei Präzipitationslinien detektiert (Abb. 36). Folglich wurde Plasmakallikrein durch PK 6 aus dem Komplex verdrängt. In einem analogen Versuch mit PK 1 wurde keine Dissoziation des Komplexes beobachtet.

Alle angeführten Versuche (D.9.5.) belegen, daß PK 6 gegen die Bindungsregion (oder einen eng benachbarten Bereich) von Plasmakallikrein für HMW Kininogen gerichtet ist. Diese Eigenschaft von PK 6 bietet eine überzeugende Erklärung für die Inhibition der PTT-Korrektur durch Prokallikrein (vgl. D.9.4.).

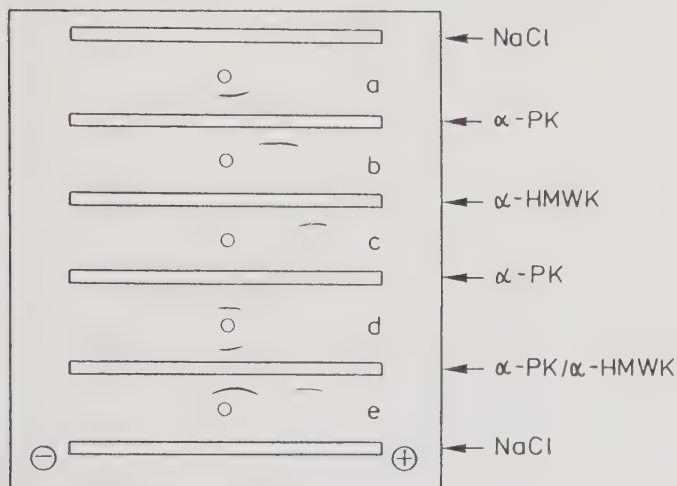


Abb. 36. Dissoziation des Plasmakallikrein-HMW Kininogen-Komplexes durch PK 6.
 α -PK: 50 μ g anti-Plasmakallikrein-IgG (Kaninchen);
 α -HMWK: 50 μ g anti-Kininogen-IgG (Kaninchen); NaCl: 0.15 M NaCl-Lösung; a: 2 μ g Plasmakallikrein + 10 μ g PK 6; b: 2 μ g Plasmakallikrein + 2 μ g HMW Kininogen; c: 2 μ g HMW Kininogen; d: 2 μ g Plasmakallikrein; e: 2 μ g Plasmakallikrein + 2 μ g HMW Kininogen + 10 μ g PK 6.

D. 10. Versuche mit biotinyliertem Prokallikrein

Die Biotinylierung von Proteinen erfolgt an freien Amino-
gruppen, typischerweise an der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten.
Die Tatsache, daß biotinyliertes Prokallikrein nicht an HMW
Kininogen bindet (s. D.9.5.), war Anlaß für weitere Versuche. Es
sollte festgestellt werden, ob die Biotinylierung von Prokali-
krein spezifisch dessen funktionelle Eigenschaften beeinflusst.

D. 10.1. Korrektur der partiellen Thromboplastinzeit von Fletcher-Plasma

Die PTT-Korrektur von Prokallikrein-Mangelplasma wurde analog D.2.2.1. durchgeführt. Im Gegensatz zu nativem Prokallikrein war das biotinylierte Protein unwirksam, d. h. es konnte die verlängerte PTT nicht normalisieren. Dieser Befund deutet auf eine essentielle Rolle von Lysinresten im Plasmakallikrein bei dessen prokoagulatorischen Wirkung hin.

D. 10.2. Bindung von monoklonalen Antikörpern an biotinyliertes Prokallikrein

Das Verhalten verschiedener Antikörper gegenüber biotinyliertem Prokallikrein wurde mit Hilfe des indirekten ELISAs untersucht. Mikrotiterplatten wurden mit nativem bzw. biotinyliertem Prokallikrein beschichtet und mit Verdünnungsreihen monoklonaler Antikörper beschickt. Die Detektion erfolgte über POD-markiertes anti-(Maus-IgG)-IgG (vgl. Abb. 37).

Während die monoklonalen Antikörper PK1 und PK 11 an natives und biotinyliertes Plasmakallikrein annähernd gleich gut binden, ist die Bindung von PK 6 und PK 4 an biotinyliertes Prokallikrein deutlich abgeschwächt. Es ist daher anzunehmen, daß Lysinreste im Epitop des Antikörpers PK 6 (und PK 4) liegen, die möglicherweise auch eine Rolle bei der Kininogen-Bindung spielen.

D. 11. Untersuchung der Kreuzreaktion von PK 6 mit Faktor XI

Plasmakallikrein konkurriert mit Faktor XI um dieselbe Bindungsregion von HMW Kininogen (Thompson et al., 1979). Da die Aminosäuresequenzen von Plasmakallikrein und Faktor XI große Homologien aufweisen (Fujikawa et al., 1986), ist es wahrscheinlich, daß die Kininogen-bindenden Regionen beider Proteine strukturell verwandt sind. Es war daher naheliegend, den Antikörper PK 6, der gegen die Kininogen-bindende Region des Plasmakallikreins gerichtet ist, auf Kreuzreaktion mit Faktor XI zu untersuchen (Abb. 38).

PK 6 zeigte eine signifikante Kreuzreaktion mit Faktor XI, während PK 4 und PK 14 nicht reagierten. Eine geringe Kreuzreaktion von PK 2 war ebenfalls feststellbar, die jedoch deutlich unter der von PK 6 lag. Das Ergebnis ist ein klares Indiz für eine strukturelle Verwandtschaft der HMW Kininogen-bindenden Regionen von Plasmakallikrein und Faktor XI.

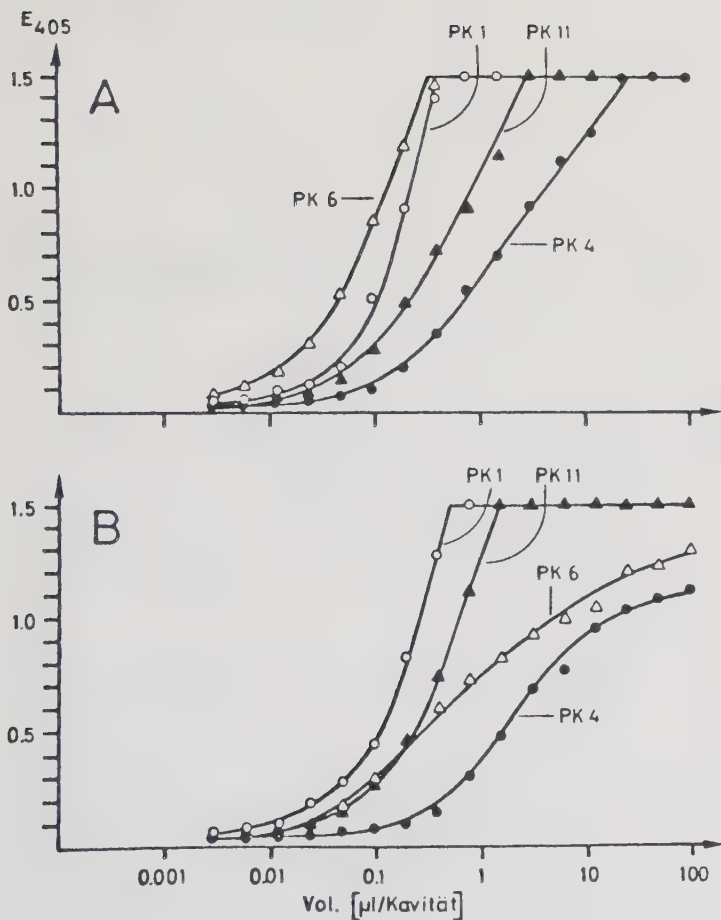


Abb. 37. Bindung von Antikörpern an biotinyliertes Prokallikrein
 Beschichtung: 0.2 $\mu\text{g/ml}$ Prokallikrein (A) bzw. biotinyliertes Prokallikrein (B)
 Abszisse: Volumen des Zellüberstands

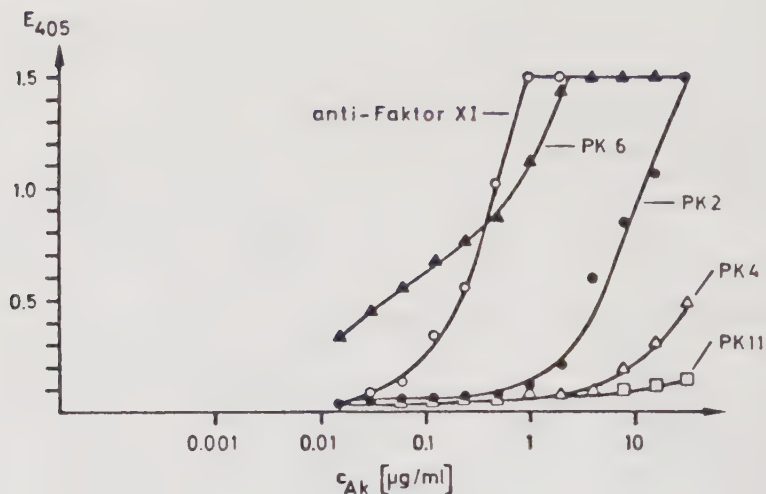


Abb. 38. Kreuzreaktion von anti-Plasmakallikrein-Antikörpern mit Faktor XI (indirekter ELISA)
 Beschichtung: 0.2 µg/ml Faktor XI; Abszisse: Antikörper-Konzentration (Ausgangsverdünnung anti-Faktor XI 1:100; Detektion mit POD-markiertem anti-(Ziegen-IgG)-IgG); anti-Faktor XI: Antiserum gegen Faktor XI (Ziege)

D. 12. Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Quantifizierung des Plasmakallikrein-C₁-Inhibitor-Komplexes im Plasma

Um eine mögliche Rolle des Plasmakallikreins bei pathologischen Prozessen zu untersuchen, die mit einer massiven Aktivierung des Gerinnungssystems einhergehen (z.B. disseminierte intravasale Gerinnung oder Polytrauma), muß das Ausmaß der Aktivierung von Prokallikrein bestimmt werden. Die Bestimmung von freiem Kallikrein ist nicht durchführbar, da das aktive Enzym im Plasma sehr schnell durch C₁-Inhibitor bzw. α₂-Makroglobulin inaktiviert wird (Lewin et al., 1983). Die resultierenden Enzym-Inhibitor-Komplexe werden nach einer bestimmten Verweilzeit im Plasma schließlich über das retikuloendotheliale System aus der Zirkulation eliminiert. Es bietet sich daher an, die Kallikreinaktivierung über die Quantifizierung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes zu verfolgen (unter physiologischen Bedingungen sind solche Komplexe im Plasma nicht nachweisbar). Da der Plasmakal-

likrein- α_2 -Makroglobulin-Komplex von Antikörpern gegen Plasmakallikrein nicht erkannt wird (Harpel et al., 1985), erscheint die Bestimmung des Plasmakallikrein-CI-Inhibitor-Komplexes für diesen Zweck am besten geeignet.

Als Testsystem wurde ein Sandwich-ELISA (C.2.2.3.c) nach dem Prinzip von Lewin et al. (1983) entwickelt.

D. 12.1. Auswahl geeigneter Antikörper gegen Plasmakallikrein und CI-Inhibitor

Verschiedene mono- und polyklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein bzw. CI-Inhibitor wurden in einem indirekten ELISA (Beschichtung 0.2 $\mu\text{g/ml}$ Komplex) auf ihre Bindung an den Komplex geprüft. Die stärksten Reaktionen wurden dabei mit polyklonalen Antikörpern sowie mit den monoklonalen Antikörpern PK 4, K 1 (anti-Plasmakallikrein) und CI 2 (anti-CI-Inhibitor) erhalten.

Im folgenden Versuch wurde eine ELISA-Platte mit Verdünnungsreihen (2^n) von poly- und monoklonalen (PK 4, K 1) Antikörpern gegen Plasmakallikrein beschichtet. Nach Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Komplex erfolgte die Detektion mit einem biotinylierten monoklonalen Antikörper gegen CI-Inhibitor (CI 2; 2 $\mu\text{g/ml}$) (Abb. 39).

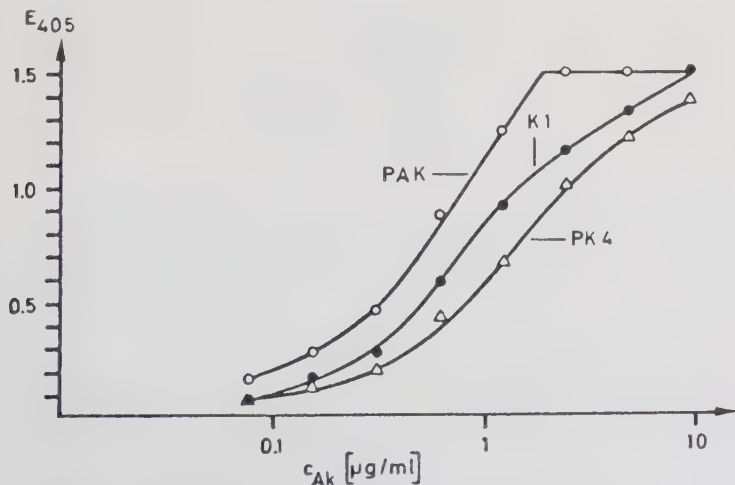


Abb. 39. Test verschiedener Antikörper gegen Kallikrein im Sandwich-ELISA

Abszisse: Konzentration der Beschichtungsantikörper
PAK: polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörper gaben das stärkste Signal; sie wurden daher als Beschichtungsantikörper (5 µg/ml) für die weiteren Versuche gewählt. Um die Sensitivität des Tests zu erhöhen, wurde in allen weiteren ELISAs der biotinylierte Antikörper CI 2 durch den nativen Antikörper ersetzt; die Detektion wurde mit biotinyliertem anti-(Maus-IgG)-IgG durchgeführt (s. C.2.2.3.c, Abb. 40). Dieser Amplifikationsschritt erhöhte die Sensitivität des Tests nochmals um den Faktor 2 - 3.

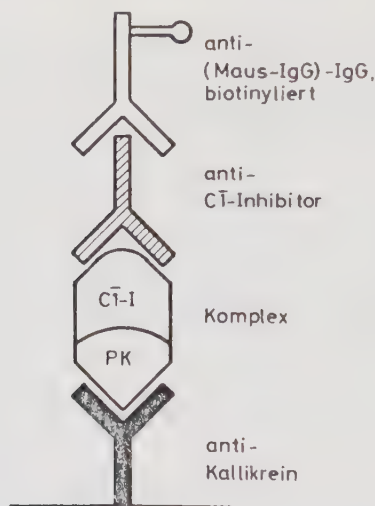


Abb. 40. Aufbau des Sandwich-ELISAs für die Komplexbestimmung C1-I: C1-Inhibitor; PK: Plasmakallikrein

D. 12.2. Spezifität des ELISAs

Um die Spezifität des Tests für den Plasmakallikrein-C1-Inhibitor-Komplex zu überprüfen, wurden Plasmakallikrein, C1-Inhibitor und Normalplasma als negative Kontrollen eingesetzt. Während der Komplex sensitiv detektiert wurde, ergaben die Einzelkomponenten C1-Inhibitor und Plasmakallikrein keinerlei Reaktion. Ebenso konnte in normalem Humanplasma kein Komplex nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen die Spezifität des Tests für den Komplex (Abb. 41).

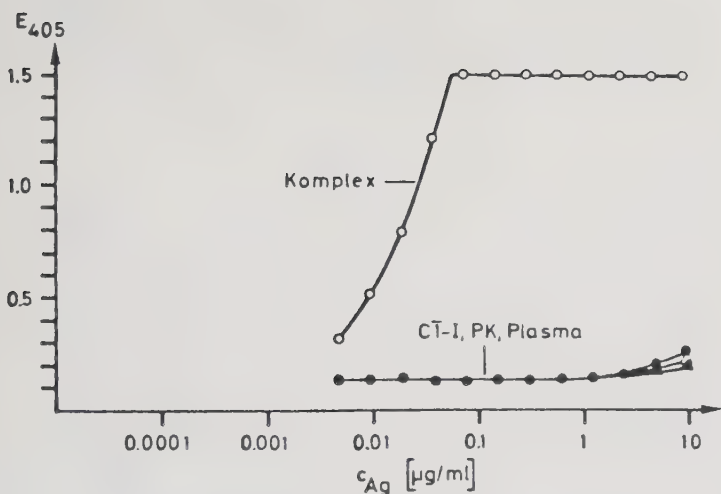


Abb. 41. Spezifität des Sandwich-ELISAs für den Plasmakallikrein- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplex

Abszisse: Konzentration der Antigene (Plasma-Ausgangsverdünnung 1:10)

$\text{C}\bar{\text{I}}$ -I: $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor; PK: Plasmakallikrein

D. 12.3. Ermittlung einer geeigneten Plasmaverdünnung für die Komplexbestimmung

Beim Testen von Plasmaproben konkurriert das freie Prokallikrein des Plasmas, das in großem Überschuß vorliegt, mit dem Komplex um den Beschichtungsantikörper. Bei zu hoher Konzentration des Plasmas wird die Bindung von Komplex durch freies Prokallikrein verhindert, bei zu hoher Verdünnung dagegen kann die Komplexkonzentration unter die Nachweisgrenze absinken. Um eine Plasmaverdünnung zu ermitteln, bei der der Komplex möglichst sensitiv detektiert werden kann, wurde ein ELISA mit verschiedenen Verdünnungen (1:20, 1:33, 1:100) von Plasma, denen eine konstante definierte Menge des gereinigten Komplexes zugesetzt worden war, durchgeführt (Abb. 42).

Eine Plasmaverdünnung von 1:100 erwies sich als geeignet. Die Nachweisgrenze für den Komplex lag hier bei ca. 3 - 4 ng/ml. Dies entspricht einer Plasmakonzentration des Komplexes von

0.3 - 0.4 $\mu\text{g/ml}$. Bei den Plasmaverdünnungen 1:20 und 1:33 lag die Nachweisgrenze deutlich höher. Die Komplekonzentration von 0.4 $\mu\text{g/ml}$ entspricht einer Komplekxierung von 0.4 % des Gesamtprokallikreins durch $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor. Damit kann die Aktivierung von Plasmakallikrein mit großer Sensitivität detektiert werden.

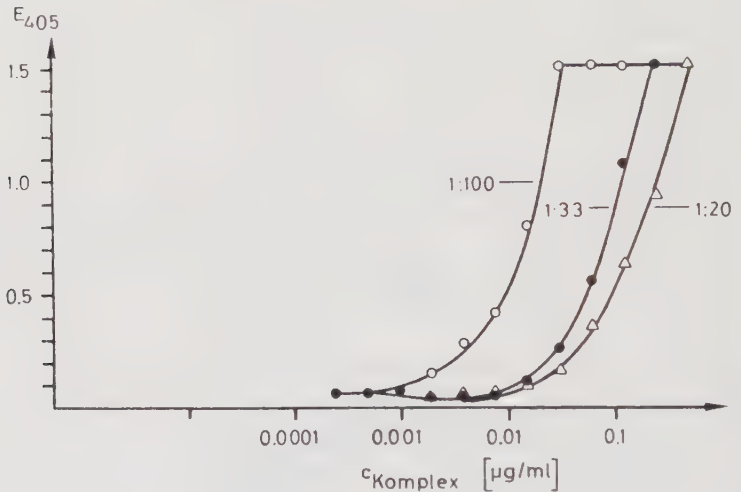


Abb. 42. Optimierung der Plasmaverdünnung für den Komplex-ELISA
Abszisse: Komplex-Konzentration

D. 12.4. Test verschiedener pathologischer Plasmen

Um die Prokallikreinaktivierung unter verschiedenen pathologischen Zuständen zu messen, wurden willkürlich ausgewählte Plasmaproben von Patienten getestet, bei denen das Gerinnungssystem aktiviert ist (Polytrauma, disseminierte intravasale Gerinnung, extrakorporale Zirkulation bei einer Bypass-Operation). Die Ergebnisse (Tab. 4) weisen darauf hin, daß unter den genannten Bedingungen tatsächlich eine Aktivierung von Plasmakallikrein (und die Bildung des Plasmakallikrein- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplexes) erfolgt, wie sie unter physiologischen Bedingungen nicht zu finden ist. Die gefundenen Werte entsprechen der Komplekxierung von 2 - 15 % des Gesamtkallikreins (50 $\mu\text{g/ml}$ Plasma) durch $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor.

Probe	Komplex ($\mu\text{g/ml}$)
Normalplasma (n=4)	0.3
Polytrauma	6.2
"	5.2
"	4.5
"	14.5
"	8.3
"	5.2
" (n=4)	0.3
DIC ²	1.6
" (n=2)	0.3
Bypass ³	1.6
"	5.7
"	0.3

Tab. 4. Plasmakallikrein-CI⁻-Inhibitor-Komplex in pathologischen Plasmen

- 1) Disseminierte intravasale Gerinnung
- 2) Plasmaproben aus der extrakorporalen Zirkulation während einer Bypass-Operation

E. DISKUSSION

Die Komplexe von Plasmakallikrein mit HMW Kininogen, einem natürlichen Substrat des Enzyms, und mit $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor, seinem wichtigsten Inhibitor, wurden mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern untersucht. Die Produktion und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper, sowie ihre mögliche Anwendung zur weiteren Erforschung des Kallikrein-Kinin-Systems sind im folgenden besprochen.

E. 1. Monoklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein

Aktives Plasmakallikrein ist ein Zweikettenmolekül. Die leichte Kette stellt den enzymatisch aktiven Teil des Proteins dar, während die schwere Kette für die Interaktion mit HMW Kininogen verantwortlich ist.

a) Produktion monoklonaler Antikörper gegen Plasmakallikrein

Nach der Immunisierung von Mäusen mit Prokallikrein konnten ausschließlich Antikörper gegen die schwere Kette des Proteins isoliert werden (PK 1, PK 2, PK 4, PK 6, PK 7, PK 8, PK 9). Dieses Resultat deutet auf eine Immundominanz der schweren Kette von Plasmakallikrein hin. Eine mit Prokallikrein immunisierte Maus, die mit der leichten Kette stimuliert wurde, sowie eine Maus, die ausschließlich mit der leichten Kette immunisiert worden war, lieferten jedoch die gewünschten Antikörper gegen die leichte Kette (PK 10 - PK 18).

b) Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen Plasmakallikrein

Die monoklonalen Antikörper wurden zunächst mittels kompetitivem ELISA auf ihre relative Epitopspezifität geprüft. Die 7 monoklonalen Antikörper gegen die schwere Kette konnten in drei Gruppen unterteilt werden, die unterschiedliche Epitope (oder Epitop-Gruppen) erkennen: Gruppe A (PK 1, PK 2, PK 8, PK 9), Gruppe B (PK 4, PK 7) und Gruppe C (PK 6). Die Epitope B und C scheinen zumindest partiell zu überlappen oder sterisch eng benachbart zu sein, da PK 4 und PK 7 durch PK 6 vom Antigen verdrängt werden können, umgekehrt aber PK 6 auch bei extrem hohem Überschuß nicht verdrängen können (vgl. D.8.2.).

Die Antikörper PK 10 - PK 16 (gegen die leichte Kette) erkannten alle dasselbe Epitop (Gruppe D). Diese Antikörper stammten aus der mit Prokallikrein immunisierten Maus; vermutlich ist

im Proenzym nur ein stark immunogenes Epitop der leichten Kette exponiert. Die Immunisierung mit der isolierten leichten Kette führte zu den Antikörpern PK 17 und PK 18, die gegen ein zweites Epitop auf der leichten Kette gerichtet sind (Gruppe E). Somit standen insgesamt 16 monoklonale Antikörper gegen Plasmakallikrein zur Verfügung, die (mindestens) 5 verschiedene Epitope auf dem Molekül erkennen (Abb. 43).

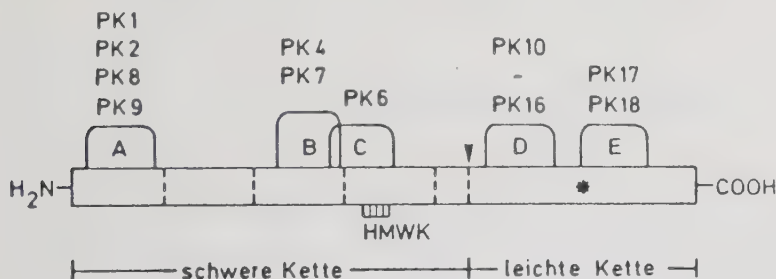


Abb. 43. Epitopzuordnung der monoklonalen Antikörper

Die relative Lage der Epitope auf der schweren bzw. leichten Kette und die Position der HMW Kininogen-Bindungsregion auf der schweren Kette von Plasmakallikrein sind willkürlich festgelegt.

A - E: Epitopgruppen; *: aktives Zentrum; V: Spaltstelle für Faktor XIIa; HMWK: mutmaßliche Bindungsregion für HMW Kininogen

Die Affinitätskonstanten (K_a) ausgewählter monoklonaler Antikörper wurden mit Hilfe eines Festphasenradioimmunoassays ermittelt. Dabei wurde festphasengebundenes Antigen mit einem Antikörper unter Zusatz von Spuren des radioaktiv markierten Antikörpers inkubiert. Nach Separation wurden gebundener und freier Antikörper bestimmt. Der Test hat den Vorteil, daß eine direkte Bestimmung sowohl von gebundenem als auch von freiem Antikörper im γ -Counter durchgeführt werden kann. Ein Nachteil ist, daß die effektive (immunologisch aktive) Konzentration des Antigens nicht bekannt ist, da die Festphasenbindung des Antigens mit der Antikörperbindung interferieren kann. Weiterhin ist die mittlere Zahl der tatsächlich gebundenen Antigenmoleküle pro Antikörpermolekül (1 - 2 für IgG) nicht bekannt. Von daher werden die erhaltenen Konstanten als "apparente" Affinitätskonstanten bezeichnet. Die Werte ($0.5 - 7.0 \times 10^8$ l/mol) liegen im Erwartungsbereich für Affinitätskonstanten monoklonaler Antikörper.

Sie spiegeln die Erfahrungswerte aus den ELISA-Messungen wider, wie an den Beispielen von PK 4 und K 1 deutlich wird. Die K_a von PK 4 liegt mit $<0,5 \times 10^8$ l/mol am unteren Ende des K_a -Bereichs; die Ergebnisse im kompetitiven ELISA (s. D.8.2.) weisen ebenfalls auf eine niedrige Affinität zum Antigen hin. Die apparente K_a von K 1 für den Plasmakallikrein-C1-Inhibitor-Komplex ist mit $1,5 \times 10^8$ l/mol um den Faktor drei höher als die entsprechende K_a für Plasmakallikrein; entsprechend bindet K 1 im indirekten ELISA besser an den Komplex als an Plasmakallikrein.

E. 2. Interaktionen der monoklonalen Antikörper mit enzymatischen Funktionen des Plasmakallikreins

Monoklonale Antikörper zeichnen sich gegenüber polyklonalen Antikörpern durch die Eigenschaft aus, daß sie nur mit einem einzigen, definierten Epitop ihres Antigens reagieren, während polyklonale Antikörper ein Gemisch aus Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope darstellen. Diese Selektivität der monoklonalen Antikörper kann ausgenützt werden, um die funktionelle Bedeutung einzelner Bereiche (Domänen) des Proteins näher zu analysieren.

Um neben der relativen Epitopspezifität und der Zuordnung zur schweren bzw. leichten Kette des Plasmakallikreins eine weitere Charakterisierung der Antikörper zu erhalten, wurden mindestens ein Vertreter jeder Antikörpergruppe (Epitope A - E) sowie polyklonale Antikörper auf ihre Interaktionen mit funktionellen Eigenschaften des Kallikreins untersucht. Im einzelnen wurden ihre Wechselwirkungen mit der proteolytischen Aktivität von Plasmakallikrein gegenüber synthetischen und natürlichen Substraten, mit der prokoagulatorischen Aktivität von Plasmakallikrein und mit der Bindung von Kallikrein an HMW Kininogen geprüft.

a) Einfluß auf die enzymatische Aktivität

Monoklonale Antikörper gegen die leichte Kette von Plasmakallikrein, die das aktive Zentrum der Proteinase trägt, übten unterschiedliche Effekte auf die Hydrolyse eines synthetischen Substrats aus: PK 14 und PK 16 (Epitop D) stimulierten überraschenderweise die Substratumsetzung. Dies ist vermutlich durch einen allosterischen Effekt zu erklären. PK 17 und PK 18 dagegen übten einen leicht hemmenden Einfluß aus, was darauf hinweist, daß ihr Epitop (E) in der Nähe des aktiven Zentrums liegen könnte (s. Abb. 43). Dagegen inhibierten polyklonale Antikörper die amidolytische Aktivität vollständig. Bei einem 10fachen

molaren Überschuß von Antikörper über Antigen dürfte dieser Effekt nicht auf einer Immunpräzipitation des Antigens, sondern tatsächlich auf einer Blockierung des aktiven Zentrums beruhen. Monoklonale Antikörper gegen die schwere Kette beeinflussten erwartungsgemäß die Substratspaltung nicht.

Der Einfluß der Antikörper auf die Proteolyse hochmolekularer Substrate wurde ebenfalls getestet. Als Modellprotein wurde HMW Kininogen, ein natürliches Substrat von Plasmakallikrein, gewählt. Keiner der getesteten monoklonalen Antikörper, darunter auch PK 6, konnte die Kininfreisetzung inhibieren. Da PK 6 die Komplexbildung von Plasmakallikrein und HMW Kininogen verhindert (s. unten), kann geschlossen werden, daß die Kininogenspaltung nicht von der Bildung des Kallikrein-HMW Kininogen-Komplexes abhängig ist.

b) Einfluß auf die prokoagulatorische Aktivität

Reines Plasmaprothrombin kann die verlängerte partielle Thromboplastinzeit (PTT) von Fletcher-Plasma bei Substitution in geeigneten Konzentrationen praktisch vollständig korrigieren. Prothrombin wurde mit verschiedenen Antikörpern präinkubiert und anschließend auf seine prokoagulatorische Aktivität im Substitutionstest untersucht. Neben den polyklonalen Antikörpern war PK 6 als einziger monoklonaler Antikörper in der Lage, die PTT-Korrektur deutlich zu inhibieren. Da PK 6 die proteolytische Aktivität von Plasmakallikrein nicht beeinflusst, wurde geschlossen, daß er über eine Wechselwirkung mit der HMW Kininogen-Bindung die Kontaktphasenaktivierung hemmt. - PK 17 und PK 18, die eine inhibitorische Wirkung im chromogenen Substrat-Test zeigten (s. oben), hatten keinen meßbaren Einfluß auf die PTT-Korrektur; vermutlich ist die durch sie bewirkte Inhibition der Enzymaktivität zu gering, um die Kontaktphasenaktivierung signifikant zu verzögern.

E. 3. Interaktionen der monoklonalen Antikörper mit der Komplexbildung von Prothrombin und HMW Kininogen

In zwei unterschiedlich konstruierten Konkurrenztests (ELISA-Prinzip) konnte gezeigt werden, daß der monoklonale Antikörper PK 6 in äquimolarer Konzentration die Bindung von HMW Kininogen an Prothrombin komplett verhindert. Alle anderen monoklonalen Antikörper hatten auch bei 50fachem molarem Überschuß keinen Einfluß auf diese Komplexbildung. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß PK 6 mit HMW Kininogen um die Kininogen-bindende Region von Plasmakallikrein konkurriert. Diese Hypothe-

se konnte untermauert werden durch den Nachweis, daß PK 6 (in 2,5fachem molarem Überschuß) den Prokallikrein-HMW Kininogen-Komplex quantitativ zu dissozieren vermag. Damit steht erstmals ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung, der als immunologische Sonde zur Lokalisierung der Kininogen-bindenden Region von Plasmakallikrein eingesetzt werden kann. Aus der Epitopenalyse von PK 6 kann abgeleitet werden, daß diese Bindungsregion auf der schweren Kette von Plasmakallikrein liegt.

Der Befund, daß biotinyliertes Prokallikrein nicht mehr an HMW Kininogen bindet (s. D.9.5.), war Anlaß für weitere Untersuchungen. Dabei wurde gefunden, daß das biotinylierte Prokallikrein auch die verlängerte PTT von Fletcher-Plasma nicht mehr korrigieren konnte. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß PK 6 (und PK 4) im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern PK 1 und PK 11 eine wesentlich geringere Affinität zu biotinyliertem als zu nativem Plasmakallikrein aufwiesen (PK 4 wurde nicht weiter untersucht, da er nicht mit der HMW Kininogen-Bindung und der Kontaktphasenaktivierung interferiert). Da bei der Biotinylierung von Proteinen primäre Aminogruppen, im wesentlichen die ϵ -Aminogruppe von Lysin, modifiziert werden, liegt der Schluß nahe, daß Lysinreste sowohl in der HMW Kininogen-Bindungsregion als auch im Epitop von PK 6 vorkommen.

E. 4. Kreuzreaktion von PK 6 mit Faktor XI

Faktor XI konkurriert mit Plasmakallikrein um die Bindung an HMW Kininogen (Thompson et al., 1979). Die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine zeigen eine hohe Homologie (58 %); der strukturelle Aufbau ist identisch (4 repetitive Einheiten der schweren Kette, Verbindungspeptid, enzymatisch aktive leichte Kette) (Fujikawa et al., 1986). In einem indirekten ELISA konnte gezeigt werden, daß PK 6 eine signifikante Kreuzreaktion mit Faktor XI zeigt. Faktor XI besitzt also ein ähnliches Zielepitop für PK 6 wie Plasmakallikrein, bei dem es sich wahrscheinlich ebenfalls um die (weitgehend konservierte) Kininogen-bindende Region handelt.

E. 5. Epitopspezifität der Antikörper

Eine wichtige Fragestellung bei der Charakterisierung monoklonaler Antikörper ist die genaue Lokalisierung ihrer Epitope auf dem jeweiligen Antigen. Eine etablierte Methode der Epitopkartierung ist die (unspezifische) proteolytische Fragmentierung des Antigens und die Immundetektion der Fragmente mit monoklona-

len Antikörpern (Alsenz et al., 1985; Wilson & Smith, 1985). Nach Isolierung und Sequenzierung der immunologisch reaktiven Fragmente kann durch Überlappungsanalyse eine Zuordnung der Epitope zu definierten Molekülbereichen erfolgen. Diese Strategie war im Fall von Plasmakallikrein nicht erfolgreich, da wegen der hohen Zahl von Disulfidbrücken in diesem Molekül ($n = 18$) eine Separation der Fragmente nur nach vorheriger Reduktion erreicht werden konnte. Durch die Reduktion der Disulfidbrücken ging jedoch die Immunreaktivität der Fragmente vollständig verloren, so daß die Detektion durch Antikörper nicht mehr möglich war. Dieses Phänomen ist ein Hinweis darauf, daß die untersuchten monoklonalen Antikörper gegen Plasmakallikrein vermutlich konformationelle Determinanten und keine sequentiellen Determinanten auf dem Antigen erkennen (Berzofsky, 1985). Sequentielle Determinanten sind auch nach Reduktion der Disulfidbrücken, d.h. Auflösung der Sekundärstruktur, noch immunreaktiv.

E. 6. Produktion monoklonaler Antikörper gegen den Plasmakallikrein-C $\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplex

Bei der Bildung kovalenter Komplexe von Serinproteinasen mit ihren Inhibitoren werden Neoantigene im Komplex exponiert, die auf den Einzelkomponenten nicht vorkommen. Gegen diese neu exponierten antigenen Determinanten können spezifische Antikörper gebildet werden. In der Regel sind diese Antikörper gegen den modifizierten Inhibitoranteil gerichtet und erkennen somit Komplexe eines Inhibitors mit verschiedenen Proteinase (Lau & Rosenberg, 1980; McDuffie et al., 1981; Wallgren et al., 1981). Prinzipiell besteht auch die Möglichkeit, Antikörper zu gewinnen, deren Zielepitop Anteile beider Komplexkomponenten umfaßt, und die folglich spezifisch für einen bestimmten Enzym-Inhibitor-Komplex sind. Diese Antikörper wären von großem Nutzen für die rasche und selektive immunologische Bestimmung von Enzym-Inhibitor-Komplexen für klinische Fragestellungen.

Um solche Antikörper gegen den Plasmakallikrein-C $\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplex zu erhalten, wurden Mäuse mit dem gereinigten Komplex immunisiert. Die erzeugten Hybridomazellen produzierten überwiegend monoklonale Antikörper, die im indirekten ELISA mit dem Komplex und jeweils einer der Einzelkomponenten praktisch gleich gut reagierten. Nur ein Antikörper (K 1) besaß eine dreifach höhere Affinität zum Komplex als zu Plasmakallikrein. Ein absolut komplexspezifischer Antikörper, der nicht mehr mit den Einzelkomponenten reagiert, wurde nicht gefunden. Vermutlich übersteigt die Zahl der antigenen Determinanten der Komplexpartner (und wahrscheinlich auch deren relative Immunogenität) die der

Neoantigene des Komplexes bei weitem.

Ein alternativer Ansatz, der dieses Problem umgehen könnte, besteht in der Erzeugung von Immuntoleranz in neugeborenen Mäusen durch Injektion von Plasmakallikrein und $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor. Bei einer Immunisierung zu einem späteren Zeitpunkt mit dem Komplex sollten dann nur noch die Komplex-Neoantigene eine Immunantwort auslösen.

E. 7. Quantifizierung des Plasmakallikrein- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplexes im Plasma

Ein ELISA zur Quantifizierung des Plasmakallikrein- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplexes wurde entwickelt, um die Aktivierung von Plasmakallikrein im Verlauf pathologischer Prozesse, die mit einer massiven Aktivierung des Gerinnungssystems einhergehen, zu verfolgen. Die Bestimmung von aktivem Plasmakallikrein ist wegen seiner raschen Inaktivierung im Plasma durch $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor bzw. α_2 -Makroglobulin prinzipiell ausgeschlossen (Lewin et al., 1983). Daher erfolgt die Bestimmung derzeit auf indirektem Wege über die Messung von Prokallikrein, die aber nur unzureichend über die aktuelle Aktivierung des Kallikreins Auskunft gibt. Die rasche Inaktivierung und Komplexbildung ermöglicht jedoch, aktiviertes Plasmakallikrein in Form seiner Inhibitor-Komplexe direkt zu quantifizieren. Da die Immundetektion von Plasmakallikrein- α_2 -Makroglobulin-Komplexen mit Antikörpern gegen Plasmakallikrein aufgrund der Käfigstruktur dieses Komplexes nicht möglich ist (Harpel et al., 1985), erschien die Bestimmung des Komplexes mit $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor geeignet, um die Plasmakallikrein-Aktivierung zu einem bestimmten Zeitpunkt zu messen.

Unter Einsatz polyklonaler Antikörper gegen Plasmakallikrein und monoklonaler Antikörper gegen $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor konnte ein Sandwich-ELISA entwickelt werden, der spezifisch eine Quantifizierung des Plasmakallikrein- $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor-Komplexes im Plasma erlaubt. Die untere Nachweisgrenze für den Komplex liegt bei ca. $0.4 \mu\text{g/ml}$; diese Konzentration resultiert aus einer Komplexierung von ca. 0.4 % des gesamten aktivierbaren Prokallikreins. Erwartungsgemäß kann im Plasma von gesunden Probanden kein Komplex nachgewiesen werden. Erste Ergebnisse bei klinischem Probengut deuten darauf hin, daß bei Erkrankungen wie disseminierter intravasaler Gerinnung, bei Polytrauma und bei Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen (extrakorporale Zirkulation) eine unphysiologische Aktivierung von Plasmakallikrein abläuft, die eine signifikante Erhöhung der Komplexkonzentration im Plasma zur Folge hat. Mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten ELISA steht somit ein sensitiver immunologischer Test zur Verfü-

gung, der die direkte Quantifizierung von aktiviertem Plasmakallikrein in Form seines C $\bar{I}$ -Inhibitor-Komplexes erlaubt.

Der Test ist in seiner derzeitigen Form mit 4 Inkubationsschritten noch relativ zeitaufwendig (ca. 8 h). Ein komplexspezifischer monoklonaler Antikörper, der nicht mit den Einzelkomponenten reagiert, könnte zu einer wesentlichen Beschleunigung beitragen, da er für die wesentlich rascher durchzuführende Variante kompetitiven ELISAs (Dauer ca. 2 - 3 h) einsetzbar wäre.

E. 8. Ausblick

Gegenwärtig wird an der Feinkartierung der Epitope monoklonaler Antikörper gegen Plasmakallikrein gearbeitet. Dabei soll unter Einsatz gentechnologischer Methoden die Lokalisation der Epitope analysiert werden (Mehra et al., 1986): eine für humanes Plasmakallikrein kodierende cDNA wurde mechanisch in kleinere Fragmente gespalten. Nach Insertion der Spaltprodukte in den Expressionsvektor λ gt11 wurde eine Genbank erhalten, die die gesamte Plasmakallikrein-cDNA repräsentiert. Eine derartige Genbank wurde uns von Dr. D. Chung (University of Washington, Seattle) zur Verfügung gestellt. Die Kallikrein-Fragmente können nun als Fusionsproteine mit β -Galactosidase nach Vermehrung des Phagen λ gt11 in *E. coli* exprimiert und mit monoklonalen Antikörpern nach dem Prinzip des indirekten ELISA immundetektiert werden. Gegenwärtig werden die Versuche zur Immundetektion der Fusionsproteine mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt; Ergebnisse liegen noch nicht vor. Der Erfolg wird auch bei diesem Verfahren davon abhängen, wie gut die Konformation der Kallikreinanteile im Fusionsprotein erhalten ist und ob eventuell Disulfidbrücken nach dem korrekten "Bauplan" gebildet werden.

Wichtigstes Ziel der Epitopkartierung ist die Lokalisierung der HMW Kininogen-Bindungsstelle. Diese Fragestellung wird zur Zeit mit einem Ansatz unter Verwendung anti-idiotypischer Antikörper bearbeitet (Herlyn et al., 1986). Immunisiert man ein Kaninchen mit einem Antikörper (hier: PK 6 vom Subtyp IgG1) aus der Maus, so werden Antikörper gegen den Maus-Antikörper gebildet. Der größte Teil dieser gebildeten Antikörper ist gegen die gemeinsamen antigenen Determinanten aller Maus-Immunglobuline vom gleichen Subtyp gerichtet (anti-isotypische Antikörper). In geringer Menge sind aber auch Antikörper gegen die Antigen-Bindungsstelle (Paratop) des Antikörpers PK 6 vertreten (anti-idiotypische Antikörper), die nur in diesem spezifischen Antikörper (PK 6), nicht aber in allen übrigen Maus-Antikörpern vorkommt. Diese anti-idiotypischen Antikörper können isoliert

werden, indem man die anti-isotypischen Antikörper durch Immunadsorption an Maus-IgG1 aus dem Antiserum entfernt und die verbleibenden anti-idiotypischen Antikörper durch Immunselektion an PK 6-Sepharose gewinnt. - Sollte die Hypothese richtig sein, daß der Antikörper PK 6 und HMW Kininogen an die gleiche Stelle von Plasmakallikrein binden (s. E.3.), dürfte die Konformation ihrer Bindungsstellen ähnlich sein. Ein Antikörper gegen das Paratop von PK 6 (anti-idiotypisch) sollte dann auch mit HMW Kininogen, d. h. mit dessen Kallikrein-Bindungsstelle reagieren (s. Abb. 44). Derzeit ist die Immunisierung von Kaninchen im Gange, Resultate sind noch nicht vorhanden.

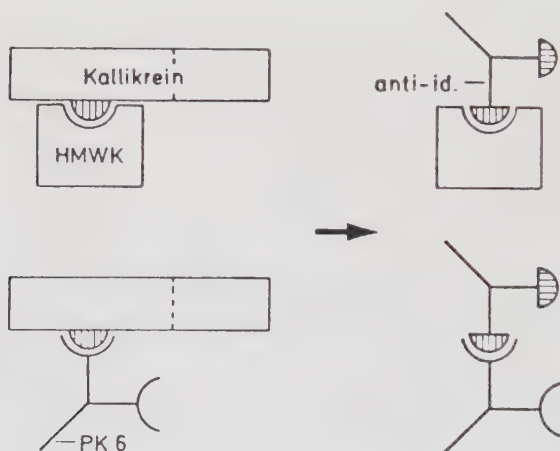


Abb. 44. Prinzip des anti-idiotypischen Ansatzes

HMWK: HMW Kininogen; anti-id.: anti-idiotypischer Antikörper

Nach Ermittlung der Aminosäuresequenz der Kininogen-Bindungsregion von Plasmakallikrein können synthetische Peptide hergestellt werden, die mit Plasmakallikrein um die Bindung an HMW Kininogen konkurrieren. Derartige Peptide (oder Peptidomimetika) sollten bei ausreichender Affinität die Kontaktphasenaktivierung und damit die endogene Gerinnungskaskade selektiv inhibieren. Damit wäre eine sinnvolle therapeutische Anwendung bei unerwünschter Kontaktphasenaktivierung, wie sie z.B. bei disseminierter intravasaler Gerinnung, bei der Hämodialyse oder bei der extrakorporalen Zirkulation vorkommt, denkbar.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Alsenz, J., Schulz, T.F., Lambris, J.D., Sim, R.B. & Dierich, M.B. (1985) Structural and functional analysis of the complement component factor H with the use of different enzymes and monoclonal antibodies to factor H. *Biochem. J.* 232, 841-850

Berzofsky, J.A. (1985) Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structures. *Science* 22, 932-940

Bock, S.C., Skriver, K., Nielsen, E., Thogersen, H.-C., Wiman, B., Donaldson, V.H., Eddy, R.L., Marrinan, J., Radziejewska, E., Huber, R., Shows, T.B. & Magnusson, S. (1986) Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 25, 4292-4301

Burger, D., Schleuning, W.-D. & Schapira, M. (1985) Human plasma prekallikrein. Immunoaffinity purification and activation to α - and β -kallikrein. *J. Biol. Chem.* 261, 324-327

Burnette, W.N. (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203

Carlsson, J., Drevin, H. & Axen, R. (1978) Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate, a new heterobifunctional agent. *Biochem. J.* 173, 723-737

Chung, D.W., Fujikawa, K., McMullen, B.A. & Davie, E.W. (1986) Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 25, 2410-2417

Cohn, E.J., Strong, E.L., Hughes, W.L.Jr., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M. & Taylor, H.L. (1946) Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 68, 459-

Cooper, N.R., Miles, L.A. & Griffin, J.A. (1979) Activation of purified C1, the first component of complement, by purified plasma kallikrein and plasmin. *Thromb. Haemostasis* 42, 251-258

Cuatrecasas, P. (1970) Protein purification by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 245, 3059-3065

de Agostini, A., Schapira, M., Wachtfogel, Y.T., Colman, R.W. & Carrel, S. (1985) Human plasma kallikrein and C $\bar{I}$ inhibitor form a complex possessing an epitope that is not detectable on the parent molecules: demonstration using a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5190-5193

DiScipio, R.G. (1982) The activation of the alternative pathway C3 convertase by human plasma kallikrein. *Immunology* 45, 587-595

Donaldson, V.H. & Evans, R.R. (1963) A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. Absence of serum inhibitor of C $\bar{I}$ -esterase. *Am. J. Med.* 35, 37-44

Donaldson, V.H., Rosen, F.S. & Bing, D.H. (1977) Role of the second component of complement (C2) and plasmin in kinin release in hereditary angioneurotic edema. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 40, 174-183

Fisher, C.A., Schmaier, A.H., Addonizio, V.P. & Colman, R.W. (1982) Assay of prekallikrein in human plasma: comparison of amidolytic, esterolytic, coagulation, and immunochemical assays. *Blood* 59, 963-970

Forbes, C.D., Pensky, J. & Ratnoff, O.D. (1970) Inhibition of activated Hageman factor and activated plasma thromboplastin antecedent by purified serum C $\bar{I}$ inactivator. *J. Lab. Clin. Med.* 76, 809-815

Fraker, P.J. & Speck, J.C. (1978) Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849-857

Frankel, M. E. & Gerhard, W. (1979) The rapid determination of binding constants for antiviral antibodies by a radioimmunoassay. An analysis of the interaction between hybridoma proteins and influenza virus. *Mol. Immunology* 16, 101-106

Frey, E.K., Kraut, H., Werle, E., Vogel, R. Zickgraf, G. & Trautschold, I. (1968) Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. Enke Verlag, Stuttgart

Fujikawa, K., Chung, D.W., Hendrickson, L.E. & Davie, E.W. (1986) Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma kallikrein. *Biochemistry* 25, 2417-2424

Galfre, G. & Milstein, C. (1981) Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth. Enzymol.* 73, 3-46

Geiger, R. (1981) The kallikrein-kinin systems. In: Proteinases and their inhibitors, Turk, V. & Vitale, L. (eds.), pp. 353-376, Pergamon Press, Oxford

Grabar, P. & Williams, C.A. (1953) Methode permettant l'etude conjuguee des proprietes electrophoretic et immunochemiques d'un melange de proteines. Application de serum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta* 10, 193-199

Harpel, P.C. (1976) C $\bar{I}$ inactivator. *Meth. Enzymol.* 45, 751-760

Harpel, P.C. & Cooper, N.R. (1975) Studies on human plasma C $\bar{I}$ inactivator-enzyme interactions. I. Mechanisms of interaction with C $\bar{I}$ s, plasmin, and trypsin. *J. Clin. Invest.* 55, 593-604

Harpel, P.C., Lewin, M.F. & Kaplan, A.P. (1985) Distribution of plasma kallikrein between C $\bar{I}$ inactivator and α_2 -macroglobulin in plasma utilizing a new assay for α_2 -macroglobulin-kallikrein complexes. *J. Biol. Chem.* 260, 4257-4263

Hathaway, W.E., Belhasen, L.P. & Hathaway, H.S. (1965) Evidence for a new plasma thromboplastin factor. I. Case report, coagulation studies and physicochemical properties. *Blood* 26, 521-532

Haupt, H., Heimbürger, N., Kranz, T. & Schwick, H.G. (1970) Ein Beitrag zur Isolierung und Charakterisierung des C $\bar{I}$ -Inaktivators aus Humanplasma. *Eur. J. Biochem.* 17, 254-261

Heimark, R.L. & Davie, E.W. (1981) Bovine and human plasma prekallikrein. *Meth. Enzymol.* 80, 157-172

Heimark, R.L., Kurachi, K., Fujikawa K. & Davie, E.W. (1980) Surface activation of blood coagulation, fibrinolysis and kinin formation. *Nature* 286, 456-460

Herlyn, D., Ross, A. & Koprowski, H. (1986) Anti-idiotypic antibodies bear the internal image of a human tumor antigen. *Science* 232, 100-102

Hojima, Y., Pierce, J.V. & Pisano, J.J. (1985) Purification and characterization of multiple forms of human plasma prekallikrein. *J. Biol. Chem.* 260, 400-406

Johnson, A.M., Alper, C.A., Rosen, F.S. & Craig, J.M. (1971) C $\bar{1}$ inhibitor: evidence for decreased hepatic synthesis in hereditary angioneurotic edema. *Science* 173, 553-554

Johnson, A.R. (1979) Effects of kinins on organ systems. In: Bradykinin, kallidin and kallikrein. Handbook of experimental pharmacology, vol. XXV, Erdös, E. G. (ed.), pp. 357-400, Springer Verlag, Berlin

Kaplan, A.P. (1979) Initiation of the intrinsic coagulation and fibrinolytic pathways of man: the role of surfaces, Hageman factor, prekallikrein, high molecular weight kininogen, and factor XI. *Prog. Haemost. Thromb.* 4, 127-175

Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Laskowski, M.Jr. & Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 593-626

Lau, H.K. & Rosenberg, R.D. (1980) The isolation and characterization of a specific antibody population directed against the thrombin-antithrombin complex. *J. Biol. Chem.* 255, 5885-5893

Lewin, M.F., Kaplan, A.P. & Harpel, P.C. (1983) Studies of C $\bar{1}$ inactivator-plasma kallikrein complexes in purified systems and in plasma. *J. Biol. Chem.* 258, 6415-6421

Lottspeich, F., Kellermann, J., Henschen, A., Foertsch, B. & Müller-Esterl, W. (1985) The amino acid sequence of the light chain of human high-molecular-mass kininogen. *Eur. J. Biochem.* 152, 307-314

- Mandle, R.Jr. & Kaplan, A.P. (1977) Hageman factor substrates. Human plasma prekallikrein: mechanism of activation by Hageman factor and participation in Hageman factor-dependent fibrinolysis. *J. Biol. Chem.* 252, 6097-6104
- Mandle, R.Jr., Colman, R.W. & Kaplan, A.P. (1976) Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 4179-4183
- McDuffie, F.C., Peterson, J.M., Clark, G. & Mann, K.G. (1981) Antigenic changes produced by complex formation between thrombin and antithrombin III. *J. Immunol.* 127, 239-244
- Mehra, V., Sweetser, D. & Young, R.A. (1986) Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7013-7017
- Müller-Esterl, W. (1986) Kininogens. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H. U., ed., pp. 304-316, Verlag Chemie, Weinheim
- Müller-Esterl, W., Rauth, G., Fritz, H., Lottspeich, F. & Henschen, A. (1983) Human kininogens. In: *Kininogenases/Kallikrein IV*, Haberland, G. L., Rohen, J. W., Fritz, H. & Huber, P. (eds.), pp. 3-28, Schattauer Verlag, Stuttgart
- Müller-Esterl, W., Hock, H., Rauth, G., Kellermann, J., Lottspeich, F. & Henschen, A. (1986) Limited proteolysis of HMW kininogen by plasma kallikrein in man. Evidence for a processing mechanism different from the bovine system. *Adv. Exp. Med. Biol.*, im Druck
- Nagase, H. & Barrett, A.J. (1981) Human plasma kallikrein. A rapid purification method with high yield. *Biochem. J.* 193, 187-192
- Neurath, H. (1964) Mechanism of zymogen activation. *Federation Proc.* 23, 1-7
- Neurath, H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224, 350-357
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R. & Morris, N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105, 361-363

Pixley, R.A., Schapira, M., & Colman, R.W. (1985) The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 260, 1723-1729

Proctor, R.R. & Rapaport, S.I. (1961) The partial thromboplastin time with kaolin. *Am. J. Clin. Pathol.* 36, 212-219

Rumpf, K.W., Becker K., Kreusch U., Schmidt S., Vetter R. & Scheler, F. (1980) Evidence for a role of plasma kallikrein in the activation of prorenin. *Nature* 283, 482-483

Saito, H., Man-Chiu, P., Vicic, W., Goldsmith, G.H.Jr. & Menitove, J.E. (1978) Human plasma prekallikrein (Fletcher factor) clotting activity and antigen in health and disease. *J. Lab. Clin. Med.* 92, 84-95

Sampaio, C., Wong, S.-C. & Shaw, E. (1974) Human plasma kallikrein. Purification and preliminary characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 133-139

Scatchard, D. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660-

Schapira, M., Silver, L.D., Scott, C.F., Schmaier, A.H., Prograis, L.J., Curd, J.G. & Colman, R.W. (1983) Prekallikrein activation and high-molecular-weight kininogen consumption in hereditary angioedema. *N. Engl. J. Med.* 308, 1050-1053

Scott, C.F. & Colman, R.W. (1980) Function and immunochemistry of prekallikrein-high molecular weight kininogen complex in plasma. *J. Clin. Invest.* 65, 413-421

Sim, R.B. & Reboul, A. (1981) Preparation and properties of human C1 inhibitor. *Meth. Enzymol.* 80, 43-54

Sim, R.B., Reboul, A., Arlaud, G.J., Villiers, C.L. & Colomb, M.G. (1979) Interaction of ¹²⁵I-labelled complement subcomponents C1r and C1s with protease inhibitors in plasma. *FEBS Lett.* 97, 111-115

Subba Rao, P.V., McCartney-Francis, N.L. & Metcalfe, D.D. (1983) An avidin-biotin microELISA for rapid measurement of total and allergen-specific human IgE. *J. Immunol. Methods* 57, 71-85

Thompson, R.E., Mandle, R.Jr. & Kaplan, A.P. (1977) Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J. Clin. Invest.* 60, 1376-1380

Thompson, R.E., Mandle, R.Jr. & Kaplan, A.P. (1979) Studies of binding of prekallikrein and factor XI to high molecular weight kininogen and its light chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4862-4866

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354

Travis, J. & Salvesen, G. (1982) Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 655-709

van der Graaf, F., Tans, G., Bouma, B.N. & Griffin, J.H. (1982) Isolation and functional properties of the heavy and light chains of human plasma kallikrein. *J. Biol. Chem.* 257, 14300-14305

van der Graaf, F., Koedam, J.A., Griffin, J.H. & Bouma, B.N. (1983) The interaction of human plasma kallikrein and its light chain with C1-inhibitor. *Biochemistry* 22, 4860-4866

Voller, A. (1980) Heterogeneous enzyme-immunoassays and their applications. In: *Enzyme-Immunoassay*, Maggio, E.T. (ed), pp. 181-196, CRC Press, Boca Raton

Wallgren, P., Nordling, K. & Björk, I. (1981) Immunological evidence for a proteolytic cleavage at the active site of anti-thrombin in the mechanism of inhibition of coagulation serine proteases. *Eur. J. Biochem.* 116, 493-496

Wallmark, A., Alm, R. & Eriksson, S. (1984) Monoclonal antibody specific for the mutant PiZ α -1-antitrypsin and its application in an ELISA procedure for identification of PiZ gene carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5690-5693

Wiggins, R.G., Giclas, P.C. & Henson, P.M. (1981) Chemotactic activity generated from the fifth component of complement by plasma kallikrein of the rabbit. *J. Exp. Med.* 153, 1391-1404

Wilson, J.E. & Smith, A.D. (1985) Monoclonal antibodies against rat brain hexokinase. J. Biol. Chem. 260, 12838-12834

Wuepper, K.D. (1973) Prekallikrein deficiency in man. J. Exp. Med. 138, 1345-1355

G. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6))
BAP	Biotin-Avidin-Peroxidase
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DTT	Dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fötales Kälberserum
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HT	Hypoxanthin-Thymidin
HMW	high molecular weight
Ig	Immunglobulin
K_a	Affinitätskonstante
kDa	kilo-Dalton
LMW	low molecular weight
M_r	relative Molekularmasse (= Molekulargewicht)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxidase
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RSA	Rinder-Serumalbumin
SBTI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SPDP	N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat

LEBENS LAUF

Name: Johann Hock
Geburtsdatum: 9.3.1956
Geburtsort: Markt Schwaben
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet seit 16.6.81 mit Marlies Hock,
geb. Stredele; Kind Matthias (geb. 9.9.84)

1962 - 1967 Grund- und Hauptschule Markt Schwaben
1967 - 1976 Gymnasium Erding
Juni 1976 Abitur
1976 - 1977 Grundwehrdienst in Pinneberg und Penzing
1977 - 1981 Studium der Pharmazie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
August 1979 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 1981 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1981 - 1982 Pharmaziepraktikum in der Marien-Apotheke,
Erding
Juli 1982 Approbation
Oktober 1982 -
September 1986 Anfertigung der vorliegenden Arbeit in der
Abteilung für Klinische Chemie und Klini-
sche Biochemie der Chirurgischen Klinik
Innenstadt der Universität München

München, im Januar 1987

